

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATASHA TIEMI FABRI

**ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE *Ocotea diospyrifolia*
(Meisn.) Mez**

CURITIBA

2018

NATASHA TIEMI FABRI

**ESTUDO FITOQUÍMICO, MORFOANATÔMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE *Ocotea diospyrifolia*
(Meisn.) Mez**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Josiane de F. G. Dias
Coorientador: Prof. Dr. Obdulio G. Miguel
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra M. W. Zanin

CURITIBA

2018

Fabri, Natasha Tiemi
Estudo fitoquímico, morfoanatômico e avaliação de atividades biológicas e propriedades antioxidantes de *Ocoteadiospyrifolia* (Meisn.) Mez / Natasha Tiemi Fabri – Curitiba, 2018.
119 f.: il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Josiane de F. G. Dias
Coorientador: Professor Dr. Obdulio G. Miguel
Coorientadora: Professora Dra. Sandra M. W. Zanin
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Lauraceae. 2. Óleos essenciais. 3. Toxicidade. I. Dias, Josiane de F. G. II. Miguel, Obdulio G. III. Zanin, Sandra M. W. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 583.931



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
<http://www.farmaceuticas.ufpr.br>




TERMO DE APROVAÇÃO

NATASHA TIEMI FABRI

Título: "Estudo fitoquímico, morfoanatômico e avaliação das atividades biológicas e propriedades antioxidantes de *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez."

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profª. Drª. Josiane de Fátima Gaspari Dias
Orientadora


Profª. Drª. Deise Prehs Montrucchio
Universidade Federal do Paraná


Profª. Drª. Marilis Dallami Miguel
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me dado as oportunidades certas nas horas certas, que me fizeram chegar até aqui. Também agradeço por ter colocado em minha vida todas as pessoas que cito abaixo, sem as quais nada disso teria se concretizado.

A minha família, em especial aos meus pais, Terezinha e Edson, por simplesmente tudo. Por sempre terem me colocado em primeiro plano, e por serem meu exemplo eterno de esforço.

Ao Kenji, meu “namorado”, que teve um papel muito importante durante essa jornada. Meu agradecimento vai muito além das inúmeras horas de consultoria estatística, ou de “Ken, veja se faz sentido o que eu estou pensando”. Você foi o meu suporte emocional, e sem a sua compreensão e dedicação eu provavelmente não teria mantido a minha (pouca) sanidade mental. Obrigada por entender a minha ausência quando era necessário.

À família do Kenji, por sempre me incentivarem mesmo que com os mais simples gestos, e as vezes sem nem saber.

À minha orientadora, Josi, por confiar no meu trabalho, e por todas as horas dispostas para que eu pudesse esclarecer as minhas dúvidas e acalmar minhas inseguranças. Obrigada por se propor a dividir seu conhecimento comigo.

Aos meus coorientadores, Obdulio e Sandra, pela contribuição nos experimentos e pelas trocas de idéias.

Às professoras Deise, Beatriz e Marilis, que aceitaram compor a banca, e se dispuseram a ler e contribuir com o meu trabalho.

À Larissa, companheira de batalha, pela parceria nos experimentos, na comilança, pela ajuda nas horas em que o cérebro falhava e pelos momentos de descontração. Você foi um dos presentes que o mestrado me deu.

À Alethéia, compartilhadora de opiniões e sofrimentos. Obrigada por sempre me ouvir, pela parceria e pelas caronas.

À Natasha Stopinski, Camila, Mari Oshiro, Fernando e aos demais integrantes do GPPN. As conversas descontraídas e risadas ajudaram a tornar o mestrado mais leve.

À Vanessa, pelas análises morfoanatômicas; à Meira, pela análise cromatográfica dos óleos; e à Francielli, pela análise de difratometria de raio X de monocristal.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade; e à CAPES, pelo apoio financeiro.

À todos que não foram citados, mas contribuíram, direta ou indiretamente, para que essa jornada fosse concluída.

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”

Trem Bala (Ana Vilela)

RESUMO

O Brasil abriga inúmeras espécies de plantas, as quais representam uma promissora fonte de descoberta de moléculas bioativas. A espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. pertence ao gênero *Ocotea* Aubl. e a família Lauraceae, grupos que tem demonstrado grande potencial farmacológico. Assim, neste trabalho objetivou-se estudar a composição fitoquímica da espécie citada, bem como avaliar suas características morfoanatômicas e atividades antioxidante e biológicas. Para este fim, folhas e galhos foram coletados no Capão do Cifloma (Curitiba-PR), a partir dos quais foram feitas as análises morfoanatômicas e de teor de cinzas e umidade, além dos extratos e fracionamentos em aparelho de Soxhlet. Ainda, a partir das folhas, foi realizada a extração do óleo essencial por hidrodestilação, e sua posterior caracterização por CG-EM. A partir dos extratos brutos e frações hexano foi realizada a quantificação de clorofilas totais e carotenoides. Essas amostras, juntamente com as demais frações e óleo essencial, foram analisadas quanto ao seu potencial antioxidante pelas metodologias de formação do complexo fosfomolibdênio, redução do radical 2,2-difenil-1-picilhidrazila (DPPH•) e peroxidação lipídica. Além disso, as amostras foram avaliadas quanto a sua toxicidade frente a *Artemia salina*, capacidade hemolítica e fitotoxicidade. Também foram aplicadas técnicas de separação, no intuito de isolar e/ou identificar compostos na espécie. Os resultados obtidos evidenciaram características morfoanatômicas condizentes com o descrito anteriormente para a espécie. O óleo essencial foi extraído a partir de duas coletas em períodos distintos, revelando a presença do espatulenol entre os componentes majoritários das duas amostras. Os ensaios antioxidantes demonstraram uma melhor atividade para as frações acetato de etila e etanólica dos galhos, e uma potencial atividade tóxica para o óleo essencial e a fração hexano do caule. As técnicas de separação aplicadas levaram ao isolamento do aminoácido 4-hidróxi-N-metilprolina da fração remanescente dos galhos. A partir disso, sugere-se que o estudo da *O. diospyrifolia* seja continuado, visto a possibilidade de aplicabilidade de seus extratos, frações óleo essencial e possíveis compostos isolados na área da farmacologia.

Palavras-chave: Lauraceae. Óleo essencial. Espatulenol. 4-hidróxi-N-metilprolina.

Toxicidade.

ABSTRACT

Brazil is home to innumerable plant species, which represent a promising source for finding new bioactive molecules. The species *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. belongs to the *Ocotea* Aubl. genus and Lauraceae family, groups that have been demonstrating huge pharmacological potential. Therefore, this work aimed to evaluate the phytochemical composition of the named species, as well as its morphoanatomical characteristics, antioxidant and biological activities. To this end, leaves and stem barks were collected in the Capão do Cifloma (Curitiba-PR), from where it was made morphoanatomical, ash and umidity content analysis, as well as the extracts and fractions in a Soxhlet apparatus. In addition, from the leaves, it was extracted the essential oils by hydrodistillation, and its further characterization by CG-MS. From the crude extracts and hexane fractions it was performed the quantification of total chlorophylls and carotenoids. These samples, together with the remaining fractions and essential oil were analysed for their antioxidant potential through the molibdenium complex formation, radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) reduction and lipid peroxidation methods. Moreover, samples were evaluated for their toxicity against *Artemia salina*, hemolytic capacity and phytotoxicity. Separation techniques were also applied, in order to isolate and/or identify compounds in the species. The results obtained highlighted morphoanatomical characteristics similar to the ones described previously for the species. The essential oil was extracted from two collections in distinct periods, revealing the presence of spathulenol as one of the major constituents in both samples. The antioxidant assays demonstrated a better activity for ethyl acetate and etanolic fraction from the stem bark, and a potential toxic activity for the essential oil and stem bark hexane fraction. Separation techniques applied lead to isolation the aminoacid 4-hydroxy-N-methylproline, from the stem bark remanescent fraction. From this, it is suggested that the study of *O. diospyrifolia* should be continued, since there is a possibility of applicability from its extracts, fractions, essential oil and possible isolated compounds in the pharmacology area.

Keywords: Lauraceae. Essential oil. Spathulenol. 4-hydroxy-N-methylproline.

Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÓXIDO DE CAPARRAPI E DA ASCARICINA	24
FIGURA 2 – ESTADOS BRASILEIROS COM OCORRÊNCIA CONFIRMADA DA ESPÉCIE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	26
FIGURA 3 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA CASCA DE <i>Ocotea suaveolens</i> (Meissn.) Hassler	27
FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO TRABALHO	28
FIGURA 5 – ESPÉCIE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. NO LOCAL DE COLETA	29
FIGURA 6 – EXSICATA E REGISTRO DE TOMBAMENTO DA ESPÉCIE <i>Ocotea</i> <i>diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	30
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA REFERENTE AO FRACIONAMENTO DO GALHO	43
FIGURA 8 – ADAPTAÇÃO DO APARELHO DE SOXHLET PARA O FRACIONAMENTO DA PORÇÃO INSOLÚVEL DO GALHO	44
FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA 4-HIDRÓXI-N-METILPROLINA	47
FIGURA 10 – DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> L., VARIEDADE Grand Rapids TBR NAS CAIXAS GERBOX.....	59
FIGURA 11 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPÉCIE <i>Ocotea</i> <i>diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	63
FIGURA 12 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA DA ESPÉCIE <i>Ocotea</i> <i>diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. EM MICROSCOPIA ÓPTICA	65
FIGURA 13 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DA ESPÉCIE <i>Ocotea</i> <i>diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. EM MICROSCOPIA ÓPTICA	66
FIGURA 14 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO GALHO DA ESPÉCIE <i>Ocotea</i> <i>diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. EM MICROSCOPIA ÓPTICA (MO) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	67
FIGURA 15 – ESTRUTURA DA 4-HIDRÓXI-N-METILPROLINA	74
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DE ANÁLISE POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. COLETADAS EM ABRIL/2016	76

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DE ANÁLISE POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. COLETADAS EM JULHO/2017	77
FIGURA 18 – ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DURANTE O (A) VERÃO - OE1 E (B) INVERNO - OE2	80
FIGURA 19 – REAÇÃO DE PRODUÇÃO DO MOLIBDÊNIO V DURANTE O ENSAIO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO	82
FIGURA 20 – REAÇÃO DE OXI-REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• COM O ANTIOXIDANTE.....	83
FIGURA 21 – REAÇÃO DO RADICAL DPPH• COM OUTRO RADICAL	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – QUANTIDADE DE MATERIAL SECO, SOLVENTE E TEMPO DE EXTRAÇÃO UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHA E GALHO	42
TABELA 2 – QUANTIDADE DE MATERIAL DE PARTIDA E DURAÇÃO DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS	44
TABELA 3 - QUANTIDADE DE MATERIAL DE PARTIDA E DURAÇÃO DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DOS GALHOS	45
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS CONTROLES POSITIVOS, EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES TESTADOS NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•	51
TABELA 5 – QUANTIDADES USADAS DE CADA COMPONENTE NO PREPARO DA SOLUÇÃO DE REAÇÃO NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO DPPH•	52
TABELA 6 - QUANTIDADES USADAS DE CADA COMPONENTE NO PREPARO DA SOLUÇÃO DE REAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	57
TABELA 7 – RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DO TEOR DE UMIDADE (%) E CINZAS TOTAIS (%) NAS FOLHAS E GALHO DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meins.) Mez.	68
TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS E GALHO DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meins.) Mez.	69
TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E GALHO DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meins.) Mez.	70
TABELA 10 – RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO DAS FOLHAS E GALHOS DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	71
TABELA 11 – RESULTADOS OBTIDOS NA BUSCA POR ALCALOIDES, FLAVONOIDES, CUMARINAS E ESTEROIDES E TRITERPENOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mes. UTILIZANDO CCD	71

TABELA 12 – CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA a, CLOROFILA b, LICOPENO E β -CAROTENO EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.....	73
TABELA 13 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE ESPÉCIES DE OCTEA.....	76
TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. COLETADAS NO VERÃO (OE1) E INVERNO (OE2).....	77
TABELA 15 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. FRENTE À RUTINA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO	82
TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO DPPH• DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	84
TABELA 17 – RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE AVALIADA PELA REDUÇÃO DO DPPH• DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl.....	85
TABELA 18 – VALORES DE F1 E F2 PARA O CONTROLE, PADRÕES E AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	88
TABELA 19 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i> DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE	90
TABELA 20 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO PADRÃO E DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE	91
TABELA 21 - RESULTADOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	93

TABELA 22 - RESULTADOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES
DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E
ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.)

Mez.97

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – COMPONENTES MAJORITÁRIOS, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE LAURACEAE	20
QUADRO 2 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.....	25
QUADRO 3 – RELAÇÃO DE SINÔNIMOS DA ESPÉCIE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez.	25
QUADRO 4 – RELAÇÃO DE REATIVOS UTILIZADOS NOS TESTES MICROQUÍMICOS	32
QUADRO 5 – FASES MÓVEIS E REVELADORES UTILIZADOS NO SCREENING FITOQUÍMICO POR CCD, FEITO COM OS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES OBTIDOS.....	45

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PELAS METODOLOGIAS DE REDUÇÃO DO DPPH• E FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO	86
GRÁFICO 2 – RESULTADOS DE HEMÓLISE EM RELAÇÃO AO TRITON 1% (A) E À ÁGUA (B) DA SAPONINA E AMOSTRAS DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE.....	92
GRÁFICO 3 – INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> cv. Grand Rapids TBR	95

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	FAMÍLIA LAURACEAE	19
2.2	GÊNERO <i>Ocotea</i> Aubl.	23
2.3	ESPÉCIE <i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez	25
3	METODOLOGIA	28
3.1	MATERIAL BOTÂNICO	29
3.1.1	Coleta e identificação	29
3.1.2	Processamento	31
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	31
3.2.1	Preparo das lâminas	31
3.2.2	Testes histoquímicos	32
3.2.3	Microscopia eletrônica de varredura	33
3.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA	33
3.3.1	Perda por dessecação	33
3.3.2	Cinzas totais	34
3.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	34
3.4.1	Extrato hidroalcoólico	35
3.4.1.1	Fracionamento do extrato hidroalcoólico	35
3.4.1.2	Pesquisa de alcaloides	35
3.4.1.3	Pesquisa de leucoantocianidinas	36
3.4.1.4	Pesquisa de flavonoides	36
3.4.1.5	Pesquisa de cumarinas	36
3.4.1.6	Pesquisa de iridoides	37
3.4.1.7	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	37
3.4.1.8	Pesquisa de esteroides e triterpenos	38
3.4.2	Extrato aquoso	38
3.4.2.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	38

3.4.2.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	39
3.4.2.3	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	39
3.4.2.4	Pesquisa de taninos	39
3.4.2.5	Pesquisa de ácidos voláteis	40
3.4.2.6	Pesquisa de ácidos fixos	40
3.4.2.7	Pesquisa de grupamento amino	41
3.5	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	41
3.5.1	Extrato bruto etanólico	41
3.5.2	Teor de sólidos totais do extrato bruto	42
3.5.3	Fracionamento	42
3.5.4	Análise por cromatografia em camada delgada (CCD).....	45
3.5.5	Quantificação de clorofilas e carotenoides	46
3.5.6	Isolamento e identificação	47
3.5.6.1	Identificação da 4-hidróxi-N-metilprolina.....	47
3.6	ÓLEO ESSENCIAL	48
3.6.1	Extração do óleo essencial.....	48
3.6.2	Caracterização do óleo essencial.....	49
3.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	49
3.7.1	Formação do complexo fosfomolibdênio	50
3.7.2	Redução do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•).....	51
3.7.3	Sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico	53
3.8	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	54
3.8.1	Avaliação da toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	54
3.8.2	Avaliação da atividade hemolítica	56
3.8.3	Avaliação da atividade fitotóxica.....	58
3.8.3.1	Atividade fitotóxica dos extratos brutos e frações	59
3.8.3.2	Atividade fitotóxica do óleo essencial	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	62
4.2	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	68
4.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	69
4.4	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	70
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES	73

4.6	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	74
4.7	ÓLEO ESSENCIAL	75
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	81
4.9	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A <i>Artemia salina</i>	89
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	91
4.11	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA	93
5.	CONCLUSÃO	98
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
	REFERÊNCIAS	100
	ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO .	119

1 INTRODUÇÃO

Os medicamentos usados atualmente para o tratamento de enfermidades derivam em sua maioria de produtos naturais, os quais incluem fungos e plantas (HARVEY, 2008). Os indivíduos pertencentes ao grupo das plantas produzem uma variedade de substâncias, o que as torna foco para a pesquisa de compostos com propriedades biológicas (GIORDANI et al., 2008). Tais moléculas produzidas por plantas são conhecidas como metabólitos secundários, e podem ser utilizadas como medicamento por si só, ou como matéria-prima para a produção de outras moléculas (BARREIRO; BOLZANI; 2009).

Nesse contexto, sabe-se que ainda existe uma demanda por novos compostos bioativos, para acompanhar a evolução do conhecimento referente às patologias (BAKER et al., 2007). Além disso, sabe-se que já existem doenças que não respondem efetivamente aos tratamentos existentes, por conta do desenvolvimento de mecanismos de resistência (BAKER et al., 2007).

Além disso, devido a sua extensão territorial, heterogeneidade geográfica e climática, o Brasil abriga aproximadamente 20% da biodiversidade mundial (equivalente a 55 mil espécies de plantas) (LEWINSOHN; PRADO, 2000), e hospeda inúmeras espécies endêmicas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010). Essa diversidade tem destaque principalmente em florestas tropicais, na região da Amazônia (LEWINSOHN; PRADO, 2000). Nesse sentido, vale ressaltar que só a Floresta Atlântica abriga em torno de 20.000 espécies vegetais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010). Ainda, sabe-se que essa variedade estende-se a parasitas, patógenos e herbívoros, os quais representam um fator estimulante para a produção de metabólitos secundários (HOWE; WESTLEY, 1988). Sendo assim, é evidente o potencial de descoberta de novas drogas a partir de espécies vegetais existentes no país.

Outro ponto a ser destacado é que, apesar do avanço nos métodos analíticos (HARVEY, 2000) e da diversidade de espécies disponíveis, apenas uma pequena porcentagem das plantas foi objeto de algum estudo fitoquímico e/ou farmacológico (PINTO et al., 2002).

Ainda, as atividades exploratórias inconsequentes podem levar a perda da biodiversidade (FEARNSIDE, 2005). Nessa lógica, vale enfatizar que 472 espécies

da flora brasileira já constam na Lista Oficial de Espécies Ameaçadas de Extinção (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010). Assim, a união desses fatores pode levar a uma perda de espécies vegetais e, conseqüentemente, de um arsenal de metabólitos secundários, os quais poderiam se tornar fontes de novos fármacos.

Entre as famílias botânicas existentes, sabe-se que a Lauraceae representa um grupo de destaque, com aplicação em diferentes áreas de interesse econômico, incluindo a indústria química e a medicina popular (MARQUES, 2001).

Dentro da família Lauraceae, o gênero *Ocotea* Aubl. tem mostrado potencial na área de produtos naturais, visto a quantidade de moléculas já isoladas (ZANIN; LORDELLO, 2001; MONTRUCCHIO et al., 2012; RAKOTONDRAIBE et al., 2015) e patentes registradas (ROUSSEL-UCLAF, 1976, ACP, 2010, UFSC; UFPR; UFSM, 2014). No âmbito das ações biológicas e farmacológicas, os extratos, óleos essenciais e compostos isolados de ocoteas já demonstraram, entre outras atividades, potencial citotóxico, antimicrobiano, leishmanicida e antinociceptivo (SALLEH; AHMAD, 2017).

Nesse contexto, essa pesquisa se justifica por investigar a fitoquímica, as atividades biológicas e propriedades antioxidantes de uma espécie vegetal pertencente a um gênero com grande potencial, para a qual foram encontrados poucos estudos, com o intuito de contribuir e agregar novas descobertas à área da saúde.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo da composição química, características morfoanatômicas, atividades biológicas e propriedades antioxidantes de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Solicitar a autorização de acesso ao patrimônio genético;
- Coletar e realizar a identificação botânica da espécie;
- Avaliar a morfoanatomia da folha, pecíolo e galho da espécie;
- Proceder as análises físico-químicas com as folhas e galhos secos;

- Realizar a análise fitoquímica preliminar das folhas e galhos da espécie;
- Proceder a extração, isolamento e identificação de compostos das folhas e galhos de *Ocotea dispyrifolia* (Meisn.) Mez;
- Quantificar as clorofilas e carotenoides nos extratos brutos e frações hexano das folhas e galhos;
- Extrair o óleo essencial das folhas e realizar a análise qualitativa;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto, frações e do óleo essencial;
- Verificar a toxicidade preliminar frente a *Artemia salina* do extrato bruto, frações e do óleo essencial;
- Verificar o potencial hemolítico do extrato bruto, frações e do óleo essencial;
- Avaliar a atividade fitotóxica do extrato bruto, frações e do óleo essencial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é reconhecida por ser um dos grupos mais primitivos dentre as angiospermas (CRONQUIST, 1998) e dicotiledôneas (SHEPHERD, 2003). Esta família é considerada uma das mais representativas, pelo número de indivíduos e diversidade de táxons (VATTIMO-GIL; 1959). Estima-se que indivíduos dessa família estejam divididos em 50 gêneros e aproximadamente 3000 espécies (ROHWER, 1993), dentre as quais predominam árvores e arbustos (VAN DER WERFF; RICHTER, 1996).

Em relação a distribuição geográfica, podem ser encontradas espécies de Lauraceae na América, Ásia, Austrália e África (VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil, foi relatada a presença de 24 gêneros e 441 espécies, enquanto no Paraná existem 12 gêneros e 66 espécies (QUINET et al., 2016).

Indivíduos dessa família têm reconhecida importância econômica e ecológica (SHEPERD et al., 2003), destacando-se o uso de espécies na culinária, indústria madeireira, indústria química e na medicina popular (MARQUES; 2001).

Também é evidente o potencial dos óleos essenciais extraídos de espécies de Lauraceae, como pode ser visto no QUADRO 1. Tais óleos apresentam grande importância na indústria farmacêutica e cosmética (RIZZINI; MORS, 1995).

QUADRO 1 – COMPONENTES MAJORITÁRIOS, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE LAURACEAE

(continua)

Espécie (parte utilizada)	Constituintes majoritários	Método de extração	Método de identificação	Atividades farmacológicas e biológicas	Referência
<i>Aniba canellilla</i> (folhas)	1-nitro-2-feniletano (88,9%/ 88,5%) ¹	Hidrodestilação	CG-FID CG-EM	Leishmanicida, citotóxica, tóxica em <i>Artemia salina</i>	Silva et al., 2009
<i>Aniba rosaeodora</i> ³	Linalol (81,27%)	Amostra comercial	CG CG-EM	Antifúngica	Simic et al., 2004
<i>Beilschmiedia kunstleri</i> (folhas)	β-cariofileno (12,1%) germacreno B (11,2%) α-cadinol (10,4%)	Hidrodestilação	CG CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2016
<i>Beilschmiedia kunstleri</i> (caule)	δ-cadineno (13,4%) β-cariofileno (10,6%)	Hidrodestilação	CG CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2016
<i>Beilschmiedia madang</i> (folhas)	δ-cadineno (17,0%) α-cubebeno (11,3%) β-cariofileno (10,3%) α-cadinol (5,8%)	Hidrodestilação	CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase	Salleh et al., 2015
<i>Beilschmiedia madang</i> (caule)	δ-cadineno (20,5%) α-cubebeno (15,6%) α-cadinol (10,6%) β-cariofileno (6,7%)	Hidrodestilação	CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase	Salleh et al., 2015
<i>Beilschmiedia maingayi</i> (folhas)	β-eudesmol (24,1%) Óxido de cariofileno (11,0%) β-panasinseno (10,2%)	Hidrodestilação	CG CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2016
<i>Beilschmiedia maingayi</i> (caule)	β-eudesmol (17,5%) Óxido de cariofileno (12,8%) β-panasinseno (11,6%)	Hidrodestilação	CG CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2016
<i>Beilschmiedia penangiana</i> (folhas)	δ-Cadineno (28,7%) germacreno D (20,7%)	Hidrodestilação	CG CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2016

QUADRO 1 – COMPONENTES MAJORITÁRIOS, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE LAURACEAEs

(continuação)

Espécie	Constituintes majoritários	Método de extração	Método de identificação	Atividades farmacológicas e biológicas	Referência
<i>Beilschmiedia penangiana</i> (caule)	δ-Cadineno (17,5%) germacreno D (14,6%)	Hidrodestilação	CG CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2016
<i>Beilschmiedia pulverulenta</i> ³	eugenol (45,3%) eugenol acetato (5,6%)	Hidrodestilação	CG-EM	Antioxidante, antimicrobiana, anticolinesterase, antitirosinase, anti-inflamatória	Salleh et al., 2015
<i>Cinnamomum glanduliferum</i> ³	1,8-cineol (41,4%) α-pineno (20,3%)	NI ²	CG-EM	Antibacteriana	Singh et al., 2015
<i>Cinnamomum tonduzii</i> ³	α-pineno (41,4%) β-pineno (25,1%)	Hidrodestilação	CG-EM	Citotóxica, antibacteriana, tóxica em <i>Artemia salina</i>	Werka, 2007
<i>Cinnamomum verum</i> ³	Benzil Benzoato Eugenol acetato Eugenol ⁴	NI ²	CG	Inibição da listeriolisina O, produção de fosfatidicolina em <i>Listeria monocytogenes</i>	Smith-Palmer; Stewart; Fyfe, 2002
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (folhas)	Eugenol (73,27%) trans-β-cariofileno (5,38%)	Amostra comercial Hidrodestilação	CG-EM	Antibacteriana	Traiano et al., 2010
<i>Endlicheria citriodora</i> (folhas)	Metil geranato (93,7%)	Hidrodestilação	CG-FID CG-EM ¹³ C RMN ¹ H RMN	Citotóxica, antitirosinase, antioxidante	Yamaguchi et al., 2013
<i>Endlicheria citriodora</i> (galhos)	Metil geranato (95,1%)	Hidrodestilação	CG-FID CG-EM ¹³ C RMN ¹ H RMN	Citotóxica, antitirosinase, antioxidante	Yamaguchi et al., 2013
<i>Laurus nobilis</i> (folhas)	1,8-cineol (35,15%) 1- <i>p</i> -menten-8- etil acetato (13,52%) linalol (7,08%) sabineno (6,17%)	NI ²	CG-EM	Antioxidante, antiproliferativa	Saab et al., 2012

QUADRO 1 – COMPONENTES MAJORITÁRIOS, MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAÍDOS DE LAURACEAEs (conclusão)

Espécie	Constituintes majoritários	Método de extração	Método de identificação	Atividades farmacológicas e biológicas	Referência
<i>Laurus nobilis</i> (semente)	B-ocimeno (21,83%) 1,8-cineol (9,43%)	NI ²	CG-EM	Antioxidante, antiproliferativa	Saab et al., 2012
<i>Laurus nobilis</i> ³	1,8-cineol(41,86%) sabineno (9,12%) α-pineno (7,2%) linalol (7,02%) α-terpinil acetato (5,49%)	Amostra comercial	CG-EM	Antifúngica	Simic et al., 2004
<i>Licaria canella</i> (folhas)	benzil benzoato (69,7%/ 73,0%) ¹	Hidrodestilação	CG-FID CG-EM	Leishmanicida, citotóxica, tóxica em <i>Artemia salina</i>	Silva et al., 2009
<i>Litsea cubeba</i> (frutos)	Sabineno (40,2%) β-felandreno (9,2%) 1,8-Cineol (9,0%) α-pineno (8,1%)	Destilação a vapor	CG-EM	Repelente contra <i>Aedes</i> spp, <i>Armigeres</i> spp, <i>Culex</i> spp	Vongsombath et al., 2012
<i>Litsea cubeba</i> (frutos)	Limonol (44,2%) β-linalol (8,8%) 1,8-cineol (5,4%)	Destilação a vapor	CG-EM	Antifúngico	Yang et al., 2010
<i>Nectandra membranacea</i> ³	α-pinene (22,4%) β-pinene (12,6%)	Hidrodestilação	CG-EM	Citotóxica, tóxica em <i>Artemia salina</i>	Werka, 2007
<i>Ocotea floribunda</i> ³	α-pineno (22,5%) β-pineno (21,3%)	Hidrodestilação	CG-EM	Citotóxica, tóxica em <i>Artemia salina</i>	Werka, 2007
<i>Sassafras albidum</i> ³	safról (82,04%)	Amostra comercial	CG-EM	Antifúngica	Simic et al., 2004
<i>Umbellularia californica</i> ³	Umbellulona (36,7%) 1,8-cineol (19,5%) Meteugenol (8,4%) timol (7,8%) terpinen-4-ol(6,6%) α-terpineol (6,5%)	Hidrodestilação	CG-EM	Repelente e larvicida contra <i>Aedes aegypti</i>	Tabanca et al., 2013

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) Coleta em locais e/ou períodos diferentes; (2) NI: Não informado; (3) Parte utilizada não citada; (4) Quantidade não informada; CG-FID = cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama; CG-EM = cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas; ¹³C RMN = ressonância magnética nuclear de carbono; ¹H RMN = ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Do ponto de vista medicinal, alguns estudos relataram a utilização de espécies de Lauraceae no tratamento de problemas de saúde. Na Jordânia, as folhas de *Laurus nobilis* L. são usadas no alívio da artrite, enquanto as cascas de *Cinnamomum ceylanicum* são recomendadas para indivíduos com diabetes e complicações pós-parto (ABUH-IRMAILEH; AFIFI, 2003). Também pode ser citado o uso de plantas do gênero *Litsea* Lam. na medicina chinesa, para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, diabetes, distúrbios inflamatórios e infecções bacterianas (KONG et al., 2015); e a utilização de *Cinnamomum zeylanicum* Blume pela população iraniana para impotência, tosse produtiva e ansiedade (MIKAILI; SHAYEGH; ASGHARI, 2012). Ainda, existem relatos do uso tradicional de *Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl para bronquite, e *Laurus azorica* (Seub.) Franco para reumatismo, infecções bacterianas e problemas respiratórios nas Ilhas da Madeira e de Porto Santo (RIVERA; OBÓN, 1995). No Brasil, a espécie *Aniba canellila* (Kunth) Mez é utilizada no tratamento de diversos problemas, incluindo artrite, febre, cólica, dispepsia e malária (BOTSARIS, 2007).

Nesse sentido, também vem sendo comprovada diversas atividades farmacológicas de espécies de Lauraceae, dentre as quais podem ser citadas: atividade anti-inflamatória (MELO et al., 2006), analgésica, antipirética, imunomoduladora (RAVINDRAN; NIRMAL-BABU; SHYLAJA, 2004), antiviral (KOHN et al., 2012) e antibacteriana (NABAVI et al., 2015).

Em relação a composição fitoquímica, os metabólitos secundários frequentemente presentes na família Lauraceae são os alcaloides, especialmente os indolizínicos, benzilisoquinolínicos, triptamínicos e aporfinóides (CORDEL; QUIRN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

2.2 GÊNERO *Ocotea* Aubl.

O gênero *Ocotea* Aubl. é constituído por cerca de 350 espécies (ROHWER, 1993), das quais aproximadamente 170 são encontradas no Brasil (QUINET et al., 2016) e 31 no Paraná (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

Dentre os gêneros pertencentes à família Lauraceae, as ocoteas são as mais representativas na medicina popular (MARQUES; 2001). Nesse sentido, vale citar o uso da *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer em dermatoses, febre, reumatismo, sífilis, gota, malária (BOTSARIS, 2007); e da infusão das folhas ou frutos de *Ocotea*

foetens (Ainton) Baill. como anti-hipertensivo (RIVERA; OBÓN, 1995). Ainda, estudos da atividade farmacológica com o gênero tem comprovado a atividade larvica contra o *Aedes aegypti* (GARCEZ et al.; 2009), anti-trombótica (BALLABENI et al. 2007) e anti-inflamatória (ZSCHOCKE et al., 2000).

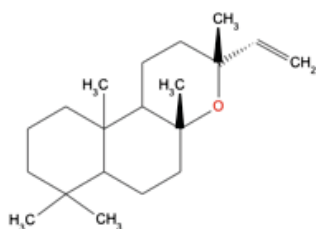
Entre as substâncias já isoladas em plantas do gênero, ganham destaque as neolignananas (DIAS; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1986; SILVA; BRAZ-FILHO; GOTTLIEB, 1989; ISHIGE, 1991; ZSCHOCKE et al., 2000) e os alcaloides (GILBERT et al., 1964; CAVA et al., 1968; VECCHIETTI; CASAGRANDE; FERRARI, 1977; DIAS et al., 2003; PABON; CUCA, 2010; GARCEZ et al., 2011).

Em relação aos alcaloides, Zanin e Lordello (2001) listaram um total de 54 alcaloides aporfinóides isolados de espécies do gênero *Ocotea* Aubl. Dentre eles pode-se citar a oconovina (CAVA et al., 1968), a coridina (GARCEZ; YOSHIDA; GOTTLIEB, 1995) e a dicentrina (MONTRUCCHIO et al., 2012). Este último foi isolado da *Ocotea puberula* (Rich.) Ness, e avaliado quanto a sua atividade farmacológica por Montrucchio et al. (2012). O estudo revelou que a dicentrina possui atividade antinociceptiva, atuando na dor neurogênica e inflamatória, além de ser o alcaloide majoritário encontrado na planta (MONTRUCCHIO et al., 2012).

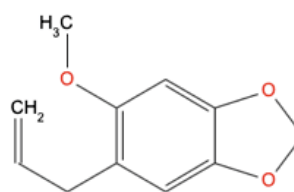
O gênero também é reconhecido pela presença de óleo essencial, os quais possuem composição variada, dependendo da espécie da qual é extraído (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). Tal diversidade na composição confere ao óleo diferentes propriedades, incluindo atividade antiplaquetária (TOGNOLINI et al., 2006), anti-hipertensiva (BARBOSA-FILHO et al., 2008) e anestésica (SILVA et al., 2013).

Dentre os compostos já isolados no óleo essencial de espécies de *Ocotea*, pode ser citado o óxido de caparrapi (FIGURA 1), identificado na *Ocotea caparrapi* (BROOKS; CAMPBELL, 1969), e a ascaricina (FIGURA 1), encontrada na *Ocotea opifera* (LORENZO et al., 2001).

FIGURA 1 – ESTRUTURA MOLECULAR DO ÓXIDO DE CAPARRAPI E DA ASCARICINA



Óxido de caparrapi



Ascaricina

FONTE: Adaptado de BROOKS; CAMPBELL, 1969; LORENZO et al., 2001.

2.3 ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez

A *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez é uma espécie arbórea que pode chegar a 20 m de altura, com período de floração entre agosto e dezembro, e frutificação de outubro a maio (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013). Seu enquadramento taxonômico pode ser visualizado no QUADRO 2.

QUADRO 2 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

Espécie	<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez
Gênero	<i>Ocotea</i> Aubl.
Família	Lauraceae Juss.
Ordem	Laurales Juss. ex Bercht. & J. Presl.
Superordem	Magnolianaes Takht.
Subclasse	Magnoliidae Novák. ex Takht.
Classe	Esquisetopsida C. Agardh.

FONTE: Adaptado de The Plant List (2013).

Essa espécie possui diversos sinônimos, relacionados no QUADRO 3, e é popularmente conhecida como canela (MARQUES, 2001) ou canela-preta (SANTOS et al., 2013). Sua principal utilização é na marcenaria e construção, especialmente na confecção de postes e tábuas de assoalho (MARQUES, 2001). Vale ressaltar que a *O. diospyrifolia* não é considerada uma espécie ameaçada de extinção (BRASIL, 2008).

QUADRO 3 – RELAÇÃO DE SINÔNIMOS DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

Sinônimo	Ano de publicação
<i>Ocotea pseudocorymbosa</i> Hassl.	1919
<i>Ocotea suaveolens</i> (Meisn.) Benth. & Hook.f. ex Hieron.	1881
<i>Ocotea suaveolens</i> var. <i>robusta</i> Hassl.	1919
<i>Oreodaphne diospyrifolia</i> Meisn.	1864
<i>Oreodaphne suaveolens</i> Meisn.	1864
<i>Strychnodaphne suaveolens</i> (Meisn.) Griseb	1879

FONTE: Adaptado de The Plant List (2013).

A espécie é comumente encontrada na Argentina, Paraguai e, no Brasil, sua ocorrência é predominantemente no Sul do país (MARQUES, 2001). Apesar disso, existem registros de sua presença em estados das regiões Norte, Centro-oeste e Sudeste (THE PLANT LIST, 2013), como mostra a FIGURA 2. No Paraná ocorre principalmente no segundo e terceiro planaltos (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013).

FIGURA 2 – ESTADOS BRASILEIROS COM OCORRÊNCIA CONFIRMADA DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.



FONTE: Adaptado de QUINET et al. (2016).

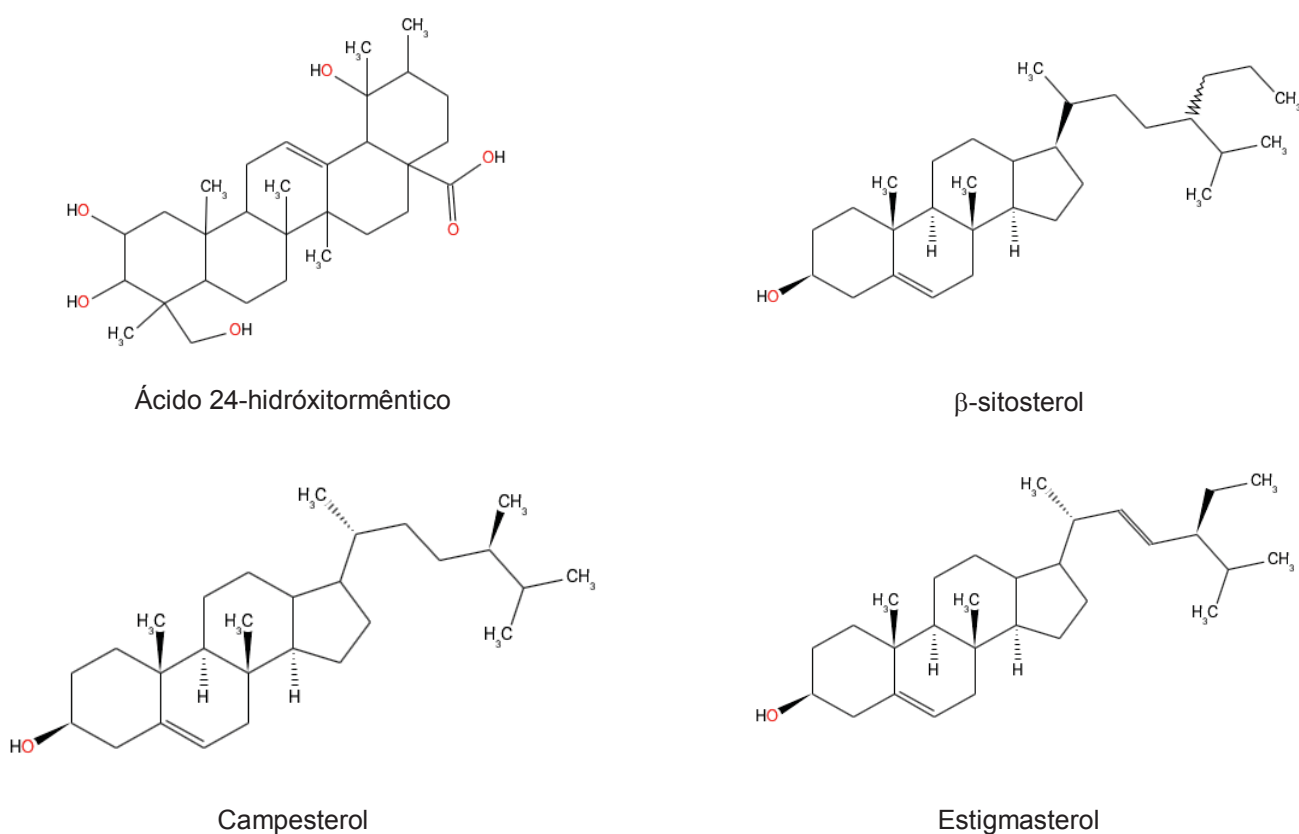
Ainda em relação a distribuição geográfica, a *O. diospyrifolia* é uma das espécies predominantes nas margens do Rio Paraguai, no Pantanal brasileiro (Mato Grosso do Sul) (DAMASCENO-JUNIOR et al.; 2004). Além disso, esta árvore é a segunda com maior número de indivíduos em uma região de transição entre a floresta ombrófila mista e a floresta estacional, no Alto Uruguai (sul do Brasil) (LOREGIAN et al., 2012). Nessa região, foi constatado que a espécie depende de luz para sua germinação, e a dispersão de suas sementes é dependente de animais (LOREGIAN et al., 2012).

No que diz respeito a fitoquímica e farmacologia da espécie, poucos estudos estão disponíveis na literatura. Dentre eles, há o relato do isolamento do ácido 24-hidróxitormêntico (FIGURA 3), um triterpeno tetracíclico, extraído da casca de *Ocotea suaveolens* (Meissn.) Hassler (BEIRITH et al., 1999). Tal espécie é conhecida como um dos sinônimos da *Ocotea diospyrifolia*. A substância isolada foi testada em ratos, e mostrou ter atividade antinociceptiva, atuando na dor visceral neurogênica e na dor inflamatória induzida por formalina (BEIRITH et al., 1999). O efeito da substância também foi testado na neurotransmissão glutamatérgica, a fim de avaliar seu papel nas reações adversas causadas por plantas de uso tradicional (MARTINI et al., 2007). De acordo com o estudo, o ácido tormêntico gera um aumento na concentração de glutamato no meio extraneuronal, o que pode levar a um efeito citotóxico (MARTINI et al.; 2007).

Também foi identificado na *Ocotea suaveolens* uma mistura dos esteroides β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (HESS, 1995), representados na FIGURA 3.

Além disso, o extrato hidroalcoólico de folhas e galhos de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez demonstrou ter atividade larvica para carrapatos (SANTOS et al., 2013).

FIGURA 3 – COMPOSTOS IDENTIFICADOS NA CASCA DE *Ocotea suaveolens* (Meissn.) Hassler

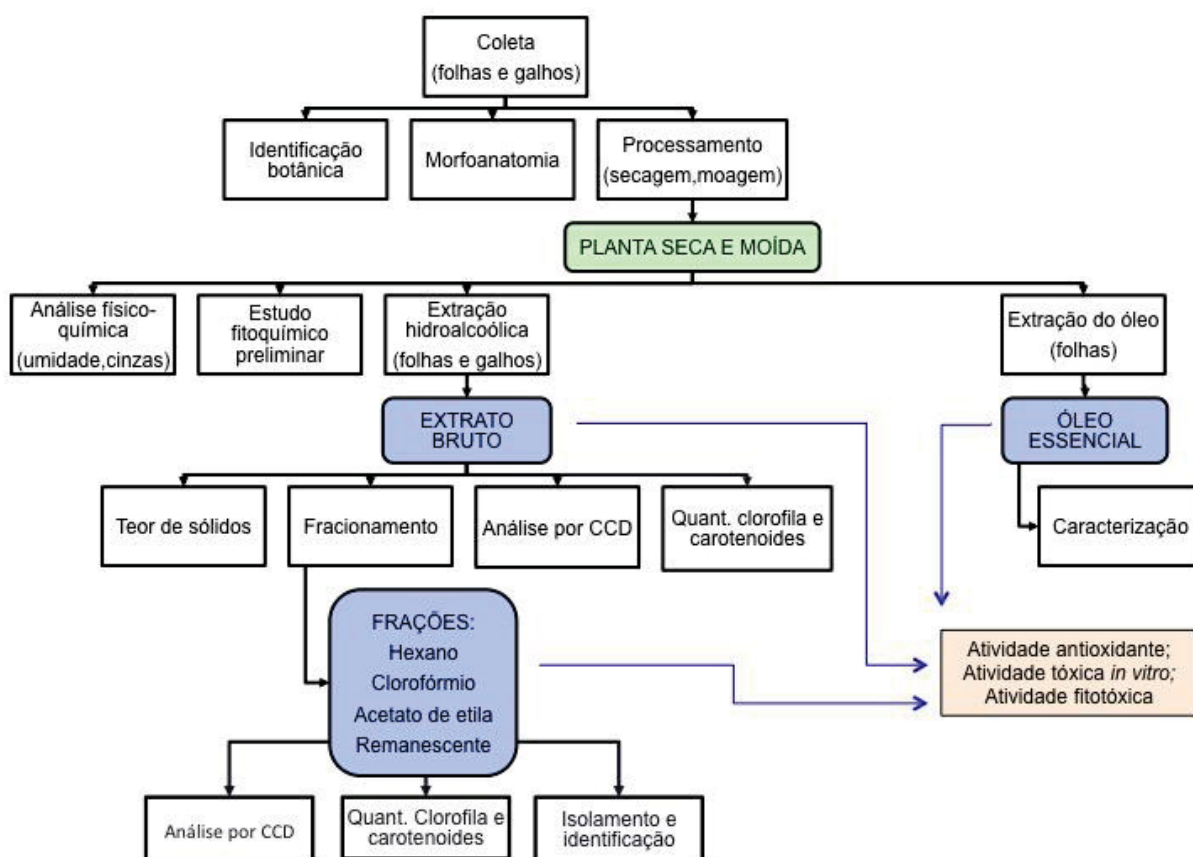


FONTE: Adaptado de Hess (1995).

3 METODOLOGIA

A parte experimental do projeto decorreu de acordo com o fluxograma representado na FIGURA 4.

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO TRABALHO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) CCD = cromatografia em camada delgada.

Após a coleta do material botânico foi realizada a identificação da espécie. Deste mesmo material foi retirada uma alíquota para o estudo morfoanatômico. Com o restante do material, foi feita a separação das folhas e galhos, e o processamento, para obter a planta seca e moída. Todos os procedimentos realizados em seguida foram feitos com as folhas e galhos separadamente. A partir do material seco, foi feita a análise físico-química, estudo fitoquímico preliminar, extração alcoólica e extração do óleo essencial.

Por sua vez, a extração alcoólica resultou em um extrato bruto, o qual foi analisado quanto ao seu teor de sólidos, composição fitoquímica (análise por CCD)

e posteriormente fracionado. A partir das frações obtidas, foram aplicadas técnicas analíticas na tentativa de isolar e caracterizar moléculas do extrato. As frações obtidas também foram analisadas quanto a sua composição fitoquímica. Ainda, os extratos brutos e frações hexano foram submetidos à quantificação de clorofilas e carotenoides. Além disso, foram avaliadas as atividades biológicas e antioxidante do extrato bruto, frações e do óleo essencial.

As etapas da FIGURA 4 estão descritas nos itens 3.1 a 3.8.

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

3.1.1 Coleta e identificação

A autorização de acesso ao patrimônio genético foi obtida junto ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), a qual consta no processo de nº 02001.001165/2013-47 (ANEXO 1).

A coleta das folhas e galhos foi realizada em dois períodos distintos, no Capão do Cifloma, localizado no Campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná (25° 26' S, 49° 14' W). Ambas as coletas foram feitas a partir do mesmo indivíduo, que está representado na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. NO LOCAL DE COLETA



FONTE: O autor (2018).

A primeira coleta ocorreu em abril de 2016, e o material obtido foi utilizado para todas as etapas descritas no fluxograma. A segunda coleta foi realizada em junho de 2017, a partir da qual apenas as folhas foram aproveitadas para a extração do óleo essencial.

A partir da amostra coletada foi confeccionada uma exsicata para a correta identificação botânica da espécie. A exsicata foi depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba (Jardim Botânico), identificada pelo Marcelo L. Brotto, e tombada sob o número MBM 385265 (FIGURA 6).

FIGURA 6 – EXSICATA E REGISTRO DE TOMBAMENTO DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.



FONTE: O autor (2018).

3.1.2 Processamento

As partes aéreas coletadas (folhas e galhos) foram separadas e secas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As folhas foram separadas com o pecíolo; porém, este conjunto de partes será referido apenas como “folha”.

Em seguida, o material foi processado em um moinho de facas e martelos, para posteriores análises.

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As análises do estudo morfoanatômico foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Para isso, folhas, pecíolos e galhos frescos foram fixados em FAA 70, o qual foi preparado a partir de 90% (v/v) de etanol 70% (v/v), 5% (v/v) de ácido acético glacial e 5% (v/v) de formaldeído 37% (v/v) (JOHANSEN, 1940). O material vegetal permaneceu nesta solução por uma semana, e em seguida foi transferido para um recipiente contendo etanol 70% (v/v), onde foi armazenado até sua análise. A partir disso, foram realizadas a preparação das lâminas (semipermanentes e permanentes), os testes histoquímicos, e as análises pelas microscopias óptica e eletrônica de varredura.

3.2.1 Preparo das lâminas

a) Lâminas semipermanentes

As folhas, pecíolos e galhos foram cortados à mão livre, de forma transversal (OLIVEIRA; AKISUE, 1997). Os cortes obtidos foram corados com azul de astra, fucsina básica e azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964), e a montagem das lâminas foi feita utilizando glicerina 50% (v/v) (BERLYN; MIKSCHKE, 1976). Em seguida, foi feita a lutagem com esmalte incolor (BEÇAK; PAULETTE, 1976).

Para obter lâminas da vista frontal, foram feitos cortes longitudinais, a mão livre (OLIVEIRA; AKISUE, 1997), e o material resultante foi deixado em água destilada. Em seguida, houve a clarificação, utilizando uma solução de hipoclorito de

sódio 10% (v/v) por um período de 24 horas. O cortes foram lavados 6 vezes com água destilada, de 15 em 15 minutos, neutralizados com ácido acético 5% (v/v), e lavados novamente. Como corante foi utilizada a safranina 1% (m/v), e as lâminas foram montadas com glicerina 50% (v/v) (FUCHS, 1963).

b) Lâminas permanentes

A montagem das lâminas permanentes foi feita no laboratório de Técnicas Histológicas, da Universidade Federal de Ponta Grossa.

A partir do material fixado foi feita a inclusão em parafina (CAPUTO; GINTINARA; MANSO, 2011) seguido de cortes transversais em micrótomo rotatório Spencer 820. Foram obtidas secções de 7 µm a 9 µm, as quais passaram por um processo de hidratação e secagem em mesa térmica (40°C). Os corantes utilizados foram o azul de astra e a fucsina básica (ROESER, 1972), e o meio de montagem empregado foi o Entellan®.

3.2.2 Testes histoquímicos

O material vegetal foi seccionado transversalmente, a mão livre. Em seguida, foram adicionados os reativos descritos no QUADRO 4 em lâminas individuais, para evidenciar a presença de substâncias químicas.

QUADRO 4 – RELAÇÃO DE REATIVOS UTILIZADOS NOS TESTES MICROQUÍMICOS

Reativo	Compostos evidenciados	Referência
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	JOHANSEN, 1940
Sudam III	Substâncias lipídicas	SASS, 1951
Floroglucina clorídrica	Lignina	FOSTER, 1949
Lugol	Amido	BERLYN; MIKSCH, 1976
Ácido sulfúrico	Natureza dos cristais	OLIVEIRA; AKISUE, 1997

FONTE: O autor (2018).

As lâminas obtidas a partir desse procedimento foram observadas em microscópio óptico Olympus CX-31, e as imagens foram registradas em uma câmera digital Olympus C7070, acoplada ao equipamento.

3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras previamente fixadas foram desidratadas em série etanólica crescente. O material resultante passou pelo processo de desidratação pelo ponto crítico seguido de metalização com ouro e paládio, no equipamento Quorum Sputter Coater SC 7620. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura Tescan Vega 3, para análise ultraestrutural de superfície (SOUZA, 2007), no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa (C-LAMBU).

3.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

3.3.1 Perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação foi realizada com as folhas e galhos separadamente, pelo método gravimétrico, descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010).

Cerca de 1 a 2 g do material seco e moído foi transferido para um cadinho previamente dessecado. A amostra foi seca em estufa (aproximadamente 105°C) até peso constante.

O resultado da perda por dessecação é representado pelo teor de umidade presente no material, e foi calculado pela fórmula **(1)**.

$$(1) U (\%) = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Onde: U (%) = teor de umidade, em porcentagem;

Pu = Peso do cadinho com a amostra antes da dessecação;

Ps = Peso do cadinho com a amostra após a dessecação;

Pa = Peso da amostra

O procedimento foi realizado em triplicata e, ao final, calculou-se a média e o desvio padrão dos teores de umidade obtidos.

3.3.2 Cinzas totais

As cinzas totais foram quantificadas nas folhas e galhos, pela metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010).

Em um cadinho previamente pesado e calcinado foi colocado cerca de 3 g da planta moída. Levou-se o material à mufla, onde este foi submetido a um aumento gradual de temperatura, até o máximo de 600°C. Após 6h, o cadinho foi retirado da mufla e esfriado em dessecador. Em seguida, calculou-se a porcentagem de cinzas totais de acordo com a fórmula (2).

$$(2) \text{ Cinzas totais (\%)} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100$$

Onde: P_1 = Peso do cadinho;

P_2 = Peso do cadinho com a amostra após a incineração;

P_3 = Peso da amostra inicial.

O ensaio foi realizado em sextuplicata, e o resultado expresso é a média \pm desvio padrão dos valores obtidos.

3.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A análise fitoquímica preliminar foi realizada com a intenção de identificar os principais grupos químicos presentes na *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. Essa busca foi feita no sentido de auxiliar o direcionamento dos experimentos.

Inicialmente, foram preparados os extratos hidroalcoólico e aquoso das folhas e galhos separadamente. A partir do extrato hidroalcoólico, foram realizadas as pesquisas de flavonoides, alcaloides, cumarinas, iridoides, antraquinonas e naftoquinonas, esteroides e terpenos; e no extrato aquoso foram pesquisadas as antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis. Para isso, foi seguida a metodologia descrita por Moreira (1979) e adaptada por Miguel (2003).

3.4.1 Extrato hidroalcoólico

Cerca de 40 g do vegetal moído foi acrescido de 200 mL de etanol 70% (v/v) e levado ao banho-maria (70°C) por cerca de uma hora, em um frasco aberto. Em seguida, o material foi filtrado em papel filtro, e o extrato obtido foi submetido ao fracionamento.

3.4.1.1 Fracionamento do extrato hidroalcoólico

O extrato foi concentrado até um terço do seu volume original. O material obtido foi colocado em funil de separação, onde foi submetido a um fracionamento sequencial, sendo inicialmente adicionado de hexano. A partição com hexano foi feita em cinco etapas, sendo que em cada uma 40 mL do solvente foi adicionado ao funil e agitado. Ao final das etapas, as porções hexânicas foram reunidas.

O processo foi repetido com os solventes clorofórmio e acetato de etila, e a porção restante foi denominada fração hidroalcoólica. Todas as frações tiveram seu volume completado para 200 mL com o respectivo solvente, quando necessário.

3.4.1.2 Pesquisa de alcaloides

Cerca de 50 mL de cada fração foi levada a secar em banho-maria. O resíduo obtido foi dissolvido em 1 mL de etanol, e acrescido de 20 mL de ácido clorídrico 1% (v/v). Em seguida, foi transferido 2 mL da solução resultante para quatro tubos de ensaio. Um dos tubos foi utilizado como controle, enquanto os outros foram testados com 5 gotas de três reativos diferentes: Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio), Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio) e Bouchardat (iodo-iodeto de potássio).

A presença de alcaloides foi evidenciada pela formação de um precipitado branco ou leve turvação branca (reativo de Mayer); ou formação de um precipitado alaranjado-tijolo (reativos de Dragendorff e Bouchardat).

3.4.1.3 Pesquisa de leucoantocianidinas

Aproximadamente 10 mL de cada fração foram transferidos para uma cápsula de porcelana e levados a secura. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em 5 mL de etanol, adicionado de 5 gotas de ácido clorídrico 37% (v/v) e aquecido até ebulição.

A presença de leucoantocianidinas foi detectada pelo desenvolvimento de coloração vermelha.

3.4.1.4 Pesquisa de flavonoides

a) Pesquisa de heterosídeos flavônicos

Foram transferidos 5 mL de cada fração para um tubo de ensaio, onde adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 37% (v/v) lentamente.

A presença de heterosídeos flavônicos foi evidenciada pelo desenvolvimento de coloração laranja (flavonas), violácea (flavononas) ou vermelha (flavonóis).

b) Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Cerca de 10 mL de cada fração foram transferidos para uma cápsula de porcelana, onde foram levados a secura. Ao resíduo obtido adicionou-se 5 gotas de acetona e 30 mg de uma mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1). A solução resultante foi novamente levada a secura, e posteriormente foram adicionados 5 mL de éter etílico. Transferiu-se o material para um tubo de ensaio e verificou-se a emissão de fluorescência na luz UV.

A presença de heterosídeos flavônicos foi detectada pela emissão de fluorescência.

3.4.1.5 Pesquisa de cumarinas

Aproximadamente 30 mL de cada fração foram transferidos para uma cápsula de porcelana, onde foram concentrados até aproximadamente 5 mL. Em seguida,

ajustou-se o pH com ácido clorídrico 2N até pH 1. O volume foi novamente concentrado até 5 mL, e o líquido resultante foi transferido para um funil de separação, onde foi extraído com éter etílico. Esse processo foi feito pela adição de 10 mL seguidos de agitação, repetido duas vezes. As frações etéreas obtidas foram reunidas e concentradas até aproximadamente 5 mL. Do volume final, cerca de 3 mL foram transferidos para um tubo de ensaio, acrescidos de hidróxido de sódio N e levados a uma câmara de luz UV por 15 minutos. A emissão de fluorescência azul ou verde amarelada indicou a presença de cumarinas.

O restante da fração etérea foi depositado em um papel filtro, formando 3 pontos separados de aproximadamente 1 cm de diâmetro. Os dois primeiros pontos foram tratados com hidróxido de sódio N, sendo o segundo ponto protegido com papel alumínio. O papel filtro foi levado a uma câmara de luz UV, por 15 minutos. A presença de cumarinas foi evidenciada pela emissão de fluorescência azul ou verde amarelada no ponto 2.

3.4.1.6 Pesquisa de iridoides

Foram transferidos cerca de 2 mL de cada fração para três tubos de ensaio. O primeiro foi acrescido de uma pequena quantidade de floroglucinol e 1 mL de ácido clorídrico 37% (v/v). Nesse caso, a presença de iridóides foi detectada pelo aparecimento de uma cor verde escura.

No segundo tubo, foram adicionadas 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sendo a reação considerada positiva para o desenvolvimento de coloração violácea.

No último tubo foi adicionado 0,5 mL de solução alcoólica de vanilina 2% (m/v) e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado. A presença de iridóides foi evidenciada pelo desenvolvimento de cor rosa cereja.

3.4.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Aproximadamente 30 mL das frações foram transferidas para balões de fundo chato, onde foram acrescidas de 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 10% (v/v). Em seguida, o balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. Passado esse tempo, a solução foi filtrada ainda quente e acrescida

de 30 mL de água destilada. A solução obtida foi transferida para um funil de separação, e a fração orgânica foi separada e concentrada até aproximadamente 5 mL. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL de hidróxido de amônio.

A presença heterosídeos antraquinônicos foi revelada pelo desenvolvimento de coloração vermelha.

3.4.1.8 Pesquisa de esteroides e triterpenos

Cerca de 2 mL de cada fração foram transferidos para um tubo de ensaio, e levados a secura. O resíduo foi dissolvido em 2 mL de ácido acético glacial e 0,2 mL de solução aquosa de cloreto férrico 1% (m/v). A mistura obtida foi transferida para um tubo de ensaio contendo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

A presença de esteroides foi evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul na zona de contato dos líquidos e na fase acética; a presença de triterpeno foi confirmada pelo desenvolvimento de coloração verde.

3.4.2 Extrato aquoso

Cerca de 40 g do vegetal moído foi acrescido de 200 mL de água destilada e levado ao banho-maria (70°C), por aproximadamente uma hora em um frasco aberto. Em seguida, o material foi filtrado em papel filtro.

3.4.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Cerca de 5mL do extrato aquoso foram transferidos para 3 tubos de ensaio. Ao primeiro, foi adicionado ácido clorídrico 1% (v/v) até pH 4, e a reação foi considerada positiva com o aparecimento de tons avermelhados. O segundo tubo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10, observando-se tons azulados se positivo. O terceiro foi neutralizado (com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico 1% v/v) até pH 7, e o aparecimento de tons violáceos indicou a presença de heterosídeos antociânicos.

3.4.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Os tubos de ensaio utilizados na pesquisa de heterosídeos antociânicos foram agitados por 5 min, com movimentos succionais. O anel de espuma foi medido logo após a agitação e após 30 minutos de repouso.

A presença de saponinas foi evidenciada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1 cm.

3.4.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Aproximadamente 5 mL de cada fração foram adicionados a um tubo de ensaio, evitando umedecer as paredes do tubo. Em seguida, 1ml de ácido sulfúrico 1N foi adicionado aos tubos, e foi suspendida uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de rolhas de cortiça. Os tubos foram mantidos em banho-maria (60°C) por 30 minutos.

A detecção de heterosídeos cianogênicos foi evidenciada pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

3.4.2.4 Pesquisa de taninos

a) Reação do cloreto férrico

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL do extrato aquoso, seguido de 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1% (m/v).

A presença de taninos foi evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul (taninos hidrolisáveis), verde (taninos condensados) ou marrom (polifenóis).

b) Reação com formol

Aproximadamente 30 mL do extrato aquoso foram transferidos para um balão de fundo chato de 250 mL de capacidade, onde foram acrescidos de 6 mL de formaldeído 40% (v/v) e 4 mL de ácido clorídrico 37% (v/v). Em seguida, o balão foi acoplado a um condensador de bolas e mantido em refluxo por uma hora. Após o

resfriamento, o extrato formolclorídrico foi filtrado e reservado para a pesquisa de taninos hidrolisáveis.

O resíduo da filtração foi lavado com etanol 50% (v/v) e, em seguida, foi gotejado uma solução aquosa de hidróxido de potássio 5% (m/v). A observação de coloração verde ao gotejar hidróxido de potássio indicou reação positiva para taninos condensados.

Ao filtrado reservado, foi adicionado excesso de acetato de sódio, sem agitação, e gotas de cloreto férrico 1% (m/v). A presença de taninos hidrolisáveis foi evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul.

3.4.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Cerca de 5 mL do extrato aquoso foram transferidos para um tubo de ensaio, e foi acrescido 1 mL de ácido sulfúrico de maneira que a parede do tubo não fosse umedecida. Em seguida, uma tira de papel tornasol foi suspensa no tubo, com o auxílio de uma rolha de cortiça. O tubo foi levado ao banho-maria (60°C), por 30 minutos, e o desenvolvimento de coloração vermelha no papel tornasol, foi considerado positivo para a presença de ácidos voláteis.

3.4.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão, foram adicionados 20 mL do extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N, que permaneceram em refluxo por 30 min. Em seguida, a solução foi acidificada com ácido clorídrico 2N e extraída com éter etílico. A fração etérea foi tratada com carvão ativo, e em seguida filtrada e levada a secar em banho-maria (50°C). O resíduo obtido foi deixado em estufa por 10 min, resfriado e acrescido de 5 mL de hidróxido de amônio 1N. Em uma tira de papel de filtro foram feitas duas manchas com a solução amoniacal. O papel foi deixado em estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. O desenvolvimento de coloração marrom na porção acrescida de reativo indicou a presença de ácidos fixos.

3.4.2.7 Pesquisa de grupamento amino

Cerca de 10 mL do extrato aquoso foram concentrados em banho-maria (60°C) até 5 mL. Em seguida, foram feitas duas manchas em papel de filtro com cinco gotas do extrato concentrado. Em uma das manchas foi gotejado o reativo de Ninhidrina 1% (m/v), e a segunda mancha foi usada como controle. O papel filtro foi levado à estufa (100°C) por 5 min. A reação foi considerada positiva com o desenvolvimento de coloração azul violácea.

3.5 ESTUDO FITOQUÍMICO

3.5.1 Extrato bruto etanólico

O preparo dos extratos brutos hidroalcoólicos foi realizado em aparelho de Soxhlet modificado (CARVALHO, 2001).

Uma quantidade adequada do material vegetal seco e moído foi colocado no aparelho de Soxhlet, o qual foi acoplado a um balão volumétrico e uma manta térmica. Em seguida foi adicionado álcool 96 °GL, de acordo com a capacidade máxima do balão. Um condensador foi conectado ao Soxhlet, para permitir que o álcool evaporado durante a extração condensasse e voltasse ao aparelho, propiciando uma extração contínua. O processo foi mantido até o esgotamento do material pelo solvente, evidenciado pela coloração límpida do etanol presente no sifão.

Os dados específicos para a produção de cada extrato bruto (folhas e galhos) podem ser vistos na TABELA 1. A extração das folhas ocorreu em apenas uma etapa; a extração dos galhos foi dividida em 3 partes, tendo em vista a quantidade de material seco disponível.

TABELA 1 – QUANTIDADE DE MATERIAL SECO, SOLVENTE E TEMPO DE EXTRAÇÃO UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHA E GALHO

	Extrato bruto folhas	Extrato bruto galhos		
		Extração 1	Extração 2	Extração 3
Material seco (g)	1.636,75	611,50	595,80	2.111,00
Quantidade de álcool 96 °GL (mL)	7.000	2.690	2.500	8.500
Ciclos de extração¹	7 ciclos	3 ciclos	3 ciclos	4 ciclos
Total de horas de extração	56 horas	24 horas	24 horas	32 horas

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) Um ciclo de extração é o equivalente a um período de 8h com o equipamento ligado, seguido de um repouso de 12h.

Cerca de 30 mL dos extratos brutos obtidos foram separados para a análise do teor de sólidos, e o restante foi concentrado em rotavapor até a evaporação do solvente. Este material foi destinado ao fracionamento.

3.5.2 Teor de sólidos totais do extrato bruto

Para determinar o teor de sólidos totais, foi seguida a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Cerca de 10 mL do extrato bruto foram colocados em placas de petri previamente dessecadas e pesadas. O material foi levado a estufa (105 °C) até peso constante. O cálculo foi realizado seguindo a formula (3).

$$(3) S (\%) = \frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Onde: S (%) = teor de sólidos totais, em porcentagem;

Pu = Peso do cadinho com amostra antes da dessecação;

Ps = Peso do cadinho com a amostra após a dessecação;

Pa = Peso da amostra

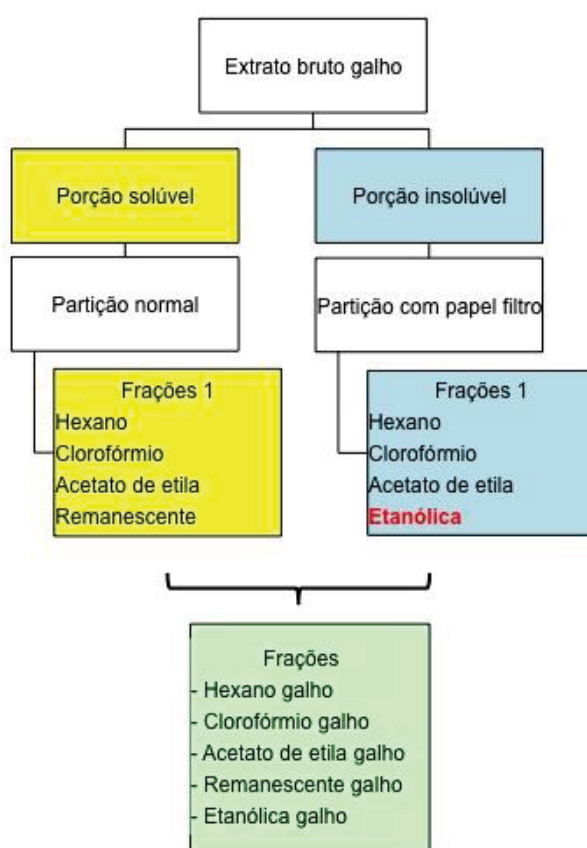
3.5.3 Fracionamento

Os extratos brutos obtidos foram fracionados separadamente em aparelho de Soxhlet modificado (CARVALHO, 2001). O processo consistiu em uma partição do tipo líquido-líquido, sendo utilizado inicialmente o solvente hexano. O aparelho foi acoplado a uma manta aquecedora e um condensador, e o sistema foi aquecido até o esgotamento do material, evidenciado pela coloração límpida do hexano presente no sifão. Em seguida, a fração hexânica foi retirada, e este processo foi repetido

com os solventes clorofórmio e acetato de etila. A porção restante do extrato foi denominada fração remanescente.

Para o fracionamento do extrato bruto do galho, foi necessário adaptar o sistema, em decorrência da formação de uma porção insolúvel após a adição do hexano. Tendo em vista que esta porção impedia o fluxo do solvente, o fracionamento do extrato bruto do galho foi realizado conforme descrito na FIGURA 7.

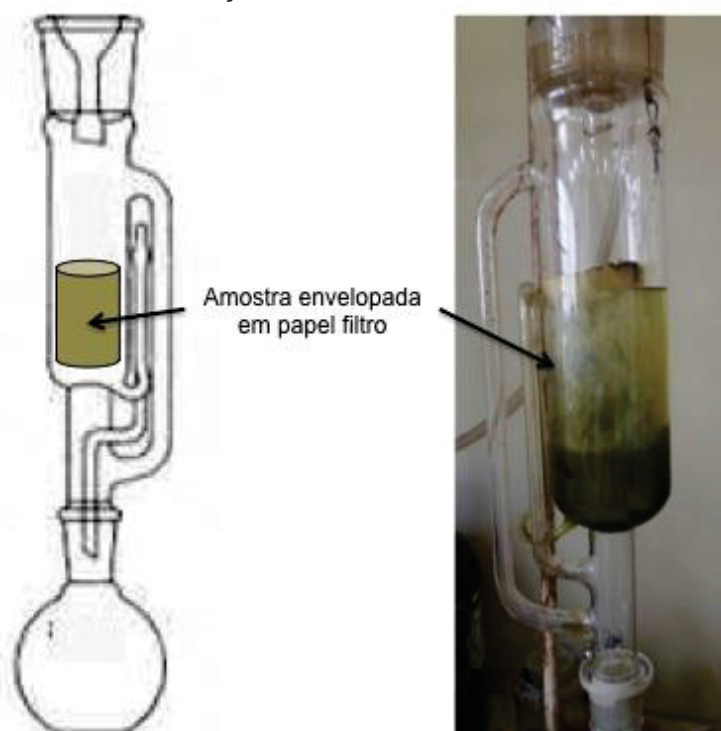
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA REFERENTE AO FRACIONAMENTO DO GALHO



FONTE: O autor (2018).

A parte solúvel do extrato foi fracionada normalmente, e a porção insolúvel foi separada e submetida à partição envelopada em um papel filtro (FIGURA 8). Após a adição do acetato de etila, a porção insolúvel foi fracionada com etanol, o qual acabou solubilizando todo o material, e gerou uma fração denominada de etanólica. Ao final do processo, a fração hexano proveniente da porção solúvel foi unida com a proveniente da porção insolúvel. O mesmo foi feito com as frações clorofórmio e acetato de etila. As frações remanescente e etanólica foram mantidas separadas, sendo assim, a partição do extrato bruto do galho resultou em uma fração adicional.

FIGURA 8 – ADAPTAÇÃO DO APARELHO DE SOXHLET PARA O FRACIONAMENTO DA PORÇÃO INSOLÚVEL DO GALHO



FONTE: O autor (2018).

Os dados específicos para os fracionamentos das folhas e galhos podem ser vistos nas TABELAS 2 e 3, respectivamente. Para alguns dos solventes, a partição foi dividida em duas ou mais partes, devido a quantidade de material a ser fracionado.

TABELA 2 – QUANTIDADE DE MATERIAL DE PARTIDA E DURAÇÃO DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS

Quantidade de extrato bruto seco utilizado (g)		257,25	
Solvente		Ciclos de fracionamento ¹	Total de horas de fracionamento
Hexano	Parte 1	6 ciclos	48 horas
	Parte 2	3 ciclos	24 horas
	Parte 3	6 ciclos	48 horas
	Parte 4	3 ciclos	24 horas
Clorórmio		3 ciclos	24 horas
Acetato de etila	Parte 1	1 ciclo	8 horas
	Parte 2	1 ciclo	8 horas

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) Um ciclo de fracionamento é o equivalente a um período de 8h com o equipamento ligado, seguido de um repouso de 12h.

TABELA 3 - QUANTIDADE DE MATERIAL DE PARTIDA E DURAÇÃO DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DOS GALHOS

Quantidade de extrato bruto seco utilizado (g)				153,78	
		PORÇÃO SOLÚVEL		PORÇÃO INSOLÚVEL	
Solvente		Ciclos de fracionamento ¹	Total de horas de fracionamento	Ciclos de fracionamento ¹	Total de horas de fracionamento
Hexano	Parte 1	4 ciclos	32 horas	2 ciclos	16 horas
	Parte 2	1½ ciclo	12 horas	-	-
Clorórmio		2 ciclos	16 horas	2 ciclos	16 horas
Acetato de etila	Parte 1	2 ciclos	16 horas	1 ciclo	8 horas
	Parte 2	1 ciclo	8 horas	-	-
Etanol		-	-	2 ciclos	16 horas

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) Um ciclo de fracionamento é o equivalente a um período de 8h com o equipamento ligado, seguido de um repouso de 12h.

As frações obtidas foram secas em rotavapor até a eliminação dos solventes e armazenadas em geladeira.

3.5.4 Análise por cromatografia em camada delgada (CCD)

Para avaliar as principais classes de compostos presentes nos extratos brutos e frações preparados, foi realizada a pesquisa por cromatografia em camada delgada (CCD).

Foi preparada uma solução metanólica das amostras na concentração de 10 mg/mL. As soluções foram aplicadas em cromatoplasas (sílica gel 60 F₂₅₄, espessura 0,25 mm, Syscroma), sendo a fase móvel e reveladores os descritos no QUADRO 5.

QUADRO 5 – FASES MÓVEIS E REVELADORES UTILIZADOS NA ANÁLISE FITOQUÍMICA POR CCD, FEITO COM OS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES OBTIDOS

Constituinte químico	Fase móvel	Revelador	Metodologia
Esteroides e triterpenos	Tolueno:Acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica 1% (v/v)	Wagner; Bladt, 1996
Flavonoides	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Reativo de NEU ¹	Wagner; Bladt, 1996
Taninos	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Cloreto férrico 1% (m/v)	Wagner; Bladt, 1996
Alcaloides	Clorofórmio:metanol (95:5) Ambiente amoniacal	Dragendorff	Valente et al., 2006
Cumarinas	Tolueno:acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU ¹ seguido de NaOH 1N	Miguel, 2003

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) difenilboriloxietilamino 1% (m/v) em metanol.

Os resultados foram registrados como presença (+) ou ausência (-) dos grupos de compostos descritos.

3.5.5 Quantificação de clorofilas e carotenoides

A quantificação das clorofilas a e b, β -caroteno e licopeno foi realizada com os extratos brutos e frações hexano, a partir de adaptações na metodologia descrita por Nagata e Yamashita (1992).

As amostras foram inicialmente preparadas na concentração de 1 mg/mL, utilizando como solvente uma mistura de acetona e hexano (4:6), em triplicata. Após serem sonicadas por 10 minutos, as soluções foram filtradas e lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 453 nm, 505 nm, 645 nm, 663 nm.

Durante as leituras, foi observado que as absorbâncias das amostras referentes à folha passavam de 1. Logo, foi necessário diluir tais soluções até a concentração de 0,33 mg/mL e 0,25 mg/mL para o extrato bruto e fração hexano, respectivamente.

A quantidade de clorofila a, clorofila b, β -caroteno e licopeno em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de amostra foi calculada conforme as fórmulas (4), (5), (6) e (7), respectivamente.

$$(4) \text{ Clorofila } a = \frac{10 \times [(-0,328 \times \text{Abs}_{663}) + (1,77 \times \text{Abs}_{645})]}{\text{Conc}}$$

$$(5) \text{ Clorofila } b = \frac{10 \times [(-0,328 \times \text{Abs}_{663}) + (1,77 \times \text{Abs}_{645})]}{\text{Conc}}$$

$$(6) \text{ Licopeno } = \frac{10 \times [(-0,0458 \times \text{Abs}_{663}) + (0,204 \times \text{Abs}_{645}) + (0,372 \times \text{Abs}_{505}) - (0,086 \times \text{Abs}_{453})]}{\text{Conc}}$$

$$(7) \text{ Beta caroteno } = \frac{10 \times [(0,216 \times \text{Abs}_{663}) - (1,22 \times \text{Abs}_{645}) - (0,304 \times \text{Abs}_{505}) + (0,452 \times \text{Abs}_{453})]}{\text{Conc}}$$

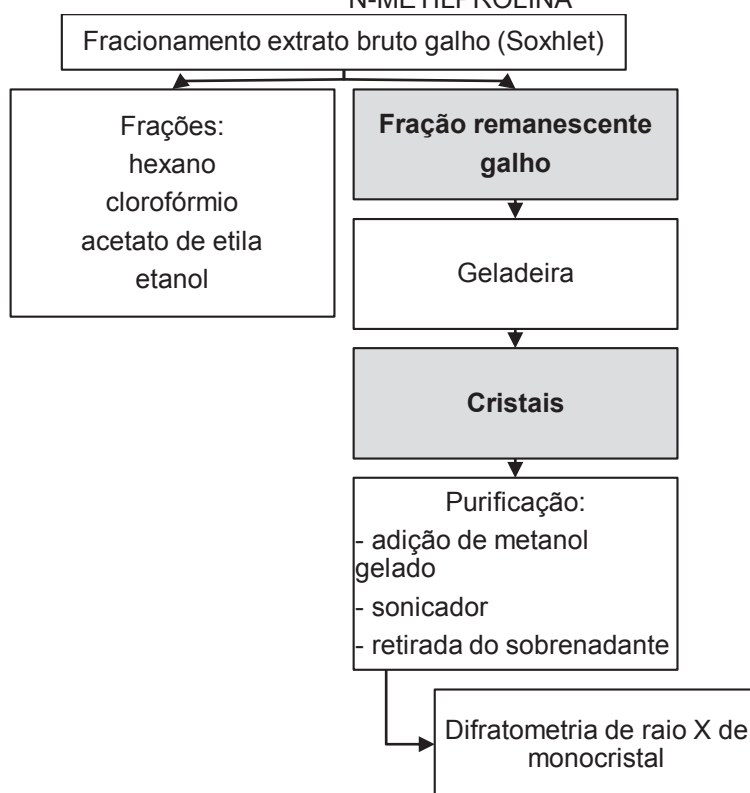
Onde: Abs_{663} = Absorbância em 663 nm;
 Abs_{645} = Absorbância em 645 nm;
 Abs_{505} = Absorbância em 505 nm;
 Abs_{453} = Absorbância em 453 nm;
 Conc = Concentração da amostra, em mg/mL.

3.5.6 Isolamento e identificação

3.5.6.1 Identificação da 4-hidróxi-N-metilprolina

A substância 4-hidróxi-N-metilprolina foi isolada e identificada a partir da fração remanescente do galho, de acordo com os processos resumidos na FIGURA 9.

FIGURA 9 – FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA 4-HIDRÓXI-N-METILPROLINA



FONTE: O autor (2018).

Após o fracionamento do extrato bruto dos galhos, a fração remanescente foi concentrada em rotavapor e armazenada em geladeira. A partir disso observou-se a formação de cristais. A purificação foi feita pela adição de metanol gelado e posterior agitação em sonicador. O metanol sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma pipeta *pasteur*, e o processo foi repetido até que o solvente estivesse límpido. Após a retirada do solvente, o cristal foi seco a temperatura ambiente.

O material foi enviado para análise por difratometria de raio X de monocristal, para elucidação da estrutura. Os dados de difração, para análise de célula unitária, foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com

detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de Mo-K α ($\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$) e Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo Kryoflex II, para realização de coletas à baixa temperatura. A análise foi realizada a 300 K utilizando-se a fonte de molibdênio. Para a realização da análise foi selecionado um fragmento cristalino de uma porção de cristais imersos em óleo mineral, o qual foi transferido cuidadosamente para um *micro-mount* que foi fixado no goniômetro do difratômetro. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*).

3.6 ÓLEO ESSENCIAL

3.6.1 Extração do óleo essencial

O óleo essencial das folhas foi extraído por hidrodestilação, em Clevenger modificado por Wasicky (1963). O processo foi realizado duas vezes, a partir de folhas coletadas em dois períodos distintos.

Para a primeira extração, feita com o material coletado em abril de 2016, 646,1 g de folhas secas e moídas foram colocadas em um balão de 6000 mL. Em seguida, foi adicionado 3.500 mL de água destilada, e o aparelho Clevenger foi acoplado ao balão. O sistema foi aquecido por manta térmica durante 6h, a partir do momento em que a primeira gota de óleo foi visualizada no tubo com escala graduada.

A segunda extração foi realizada com as folhas coletadas em junho de 2017. O processo foi semelhante ao descrito para a primeira extração, porém nesse caso foi utilizado 483,78 g de folhas secas.

Os óleos obtidos foram armazenados separadamente em frascos de vidro, protegidos da luz e sob refrigeração. Os rendimentos foram calculados segundo a fórmula (8).

$$(8) R (\%)(v/m) = \frac{v \times 100}{m}$$

Onde: R (%) (v/m) = rendimento, em porcentagem, expresso em volume por massa;
v = volume de óleo essencial obtido, em mL;
m = quantidade de material seco utilizado, em gramas.

3.6.2 Caracterização do óleo essencial

A caracterização da composição química dos óleos essenciais foi feita no Departamento de Química da UFPR. As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu® CGMS QP2010 Plus, utilizando uma coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Foi injetado 1 µL de amostra, no modo split, a uma temperatura de 250°C. A coluna foi mantida a 60°C, pressão de 59 kPa e fluxo de 1,02 mL/min. Como gás de arraste foi utilizado o hélio, e o tempo de corrida foi de 65 minutos.

A identificação dos compostos foi feita a partir dos índices de retenção (determinados usando como referência uma série de alcanos homólogos), e por comparação dos espectros de massa obtidos com dados da literatura (ADAMS, 2007).

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi avaliada por 3 metodologias distintas: formação do complexo fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), avaliação da capacidade de redução do DPPH• (adaptado de MENSOR et al., 2006) e sistema de co-oxidação β-caroteno/ácido linoleico (adaptado de RUFINO et al., 2006).

Para as 3 metodologias, as amostras testadas foram os extratos brutos e frações das folhas e galhos, e o óleo essencial das folhas proveniente da segunda extração. Como controle positivo, foi utilizado o ácido ascórbico, rutina e BHT.

3.7.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Para a realização deste ensaio, as amostras e controles positivos foram preparados na concentração de 200 µg/mL. O solvente utilizado para as amostras foi uma mistura de DMSO e metanol (1:1); para os controles positivos foi utilizado apenas o metanol.

O reativo foi preparado no dia do ensaio, e foi composto de ácido sulfúrico (0,6 M), fosfato de sódio (28 mM) e molibdato de amônio (4 mM).

Para que a reação ocorresse, em um tubo de ensaio foi adicionado 3 mL do reativo e 0,3 mL da amostra, controle positivo ou branco. Os tubos foram tampados e aquecidos em banho-maria (95 °C), por cerca de 90 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma microplaca de 96 poços, a qual foi lida em espectrofotômetro UV (690 nm). O teste foi realizado em triplicata.

Como branco foi usado o metanol acrescido de DMSO e, no caso dos controles positivos, apenas o metanol.

A capacidade antioxidante foi calculada de acordo com a fórmula (9).

$$(9) \text{ AAR (\%)} = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco} \times 100}{Abs_{padrão} - Abs_{branco}}$$

Onde: AAR (%) = atividade antioxidante relativa ao padrão;
 Abs_{amostra} = absorbância da amostra;
 Abs_{branco} = absorbância do branco;
 Abs_{padrão} = absorbância do padrão.

A análise estatística foi feita pelo teste de ANOVA e o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95%. Para realizar essas análises, foi utilizado o software Sisvar (FERREIRA, 2014).

3.7.2 Redução do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•)

a) Atividade dos extratos e frações

Foi preparada uma solução-mãe de cada amostra ou controle positivo, na concentração de 1 mg/mL, utilizando como solvente o metanol. Para as amostras foi necessário adicionar Tween 80®, na proporção de 1:1 em relação ao peso da amostra, para auxiliar na solubilização. A partir da solução-mãe foram feitas as diluições com metanol, nas oito concentrações desejadas, escolhidas de modo a abranger os valores de CI_{50} . As concentrações testadas para cada amostra e controle positivo podem ser vista na TABELA 4.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES DOS CONTROLES POSITIVOS, EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES TESTADOS NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH•

	Amostra	Concentrações testadas	
		Faixa (µg/mL)	Δ^1
	Ácido ascórbico	2 – 9	1
	BHT	6 – 20	2
	Rutina	3 – 10	1
Folha	Extrato bruto	100 – 450	50
	Fração hexano	150 – 500	50
	Fração clorofórmio	25 – 200	25
	Fração acetato de etila	25 – 200	25
	Fração remanescente	150 – 500	50
Galhos	Extrato bruto	25 – 200	25
	Fração hexano	350 – 700	50
	Fração clorofórmio	75 – 250	25
	Fração acetato de etila	20 – 90	10
	Fração remanescente	25 – 200	25
	Fração etanólica	20 – 90	10

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) variação entre as concentrações testadas

Em seguida, cada concentração foi acrescida da solução metanólica de DPPH• (0,3 mmol/L) diretamente na placa de 96 poços, conforme descrito na TABELA 5. O ensaio foi realizado em triplicata.

O controle negativo utilizado foi o metanol para os padrões, e metanol acrescido de Tween 80® para as amostras. Ainda, para cada concentração foi preparado um branco, para eliminar a influência da cor das soluções (TABELA 5). Como controle positivo foi utilizado o ácido ascórbico, BHT e rutina.

TABELA 5 – QUANTIDADES USADAS DE CADA COMPONENTE NO PREPARO DA SOLUÇÃO DE REAÇÃO NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO DPPH•

	Solução de amostra/ controle positivo	Metanol/ Metanol + Tween 80®	Solução metanólica DPPH•
Amostras/ controles positivos	140 µL	-	60 µL
Controle negativo	-	140 µL	60 µL
Branco	140 µL	60 µL	-

FONTE: O autor (2018).

Após a adição da solução metanólica de DPPH•, a placa foi mantida ao abrigo da luz por 30 minutos, e em seguida foi lida em espectrofotômetro (540 nm).

Com as leituras das absorbâncias, foi calculada a capacidade de cada concentração das amostras em reduzir o radical DPPH• **(10)**.

$$(10) \% \text{ Inibição da oxidação do DPPH} = \frac{100 - (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{(Abs_{controle} - Abs_{branco})}$$

Onde: Abs_{amostra} = absorbância da amostra;
Abs_{branco} = absorbância do branco;
Abs_{controle} = absorbância do controle negativo.

A partir dos valores calculados com a fórmula acima, montou-se uma curva % de inibição da oxidação vs concentração (µg/mL). O valor de IC₅₀ (µg/mL) foi estimado utilizando a equação da reta obtida.

A análise estatística foi feita pelo teste de ANOVA e o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95%. Para realizar essas análises, foi utilizado o software Sisvar (FERREIRA, 2014).

b) Atividade do óleo essencial

O óleo essencial e os controles positivos foram preparados na concentração de 200 µg/mL. Como solvente foi utilizado o metanol e, no caso do óleo, foi adicionado Tween 80® na proporção de 1:1 em relação ao peso da amostra.

A reação ocorreu como descrito para os extratos e frações, e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição, calculados pela fórmula **(10)**. Não foi feita uma curva % de inibição da oxidação vs concentração ($\mu\text{g/mL}$), visto que apenas uma concentração foi testada. Nesse caso os valores de % de inibição obtidos para a amostra foram comparados aos valores dos controles positivos, na mesma concentração.

A análise estatística foi feita pelo teste de ANOVA e o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95%. Para realizar essas análises, foi utilizado o software Sisvar (FERREIRA, 2014).

3.7.3 Sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico

Para avaliar a inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, as amostras (extratos, frações e óleo essencial) foram preparadas em metanol, a uma concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Como padrões foram utilizados o ácido ascórbico, BHT e rutina, diluídos da forma descrita para as amostras.

Uma emulsão do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi preparada em um erlenmeyer, adicionando 40 μL de ácido linoleico, 530 mg de Tween 80®, 50 μL de uma solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) e 20 mL de água destilada previamente tratada com oxigênio por 30 minutos. O tratamento da água destilada foi realizado por um oxigenador de aquário.

Para a determinação da atividade antioxidante, 20 μL da amostra ou padrão foi colocada em uma microplaca de 96 poços, seguido de 150 μL da emulsão do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Como branco foi utilizado 20 μL de metanol. A microplaca foi lida em 470 nm, incubada a 50°C e lida novamente a cada 15 minutos, até 120 minutos.

Com as absorbâncias obtidas foi realizado o cálculo de atividade antioxidante (%), pela fórmula **(11)**.

$$(11) \text{ Proteção (\%)} = \left[1 - \frac{(Abs\ inicial_{amostras} - Abs\ final_{amostras})}{Abs\ inicial_{branco} - Abs\ final_{branco}} \right] \times 100$$

Onde: Abs inicial amostra = absorbância do branco em 0 minutos;
 Abs final amostras = absorbância do branco em 120 minutos;
 Abs inicial branco = absorbância da amostra em 0 minutos;
 Abs final branco = absorbância da amostra em 120 minutos.

Ainda, os valores de absorbância obtidos a cada 15 minutos foram plotados em um gráfico, de onde foram obtidas as equações das curvas. A partir disso, calculou-se a eficiência do antioxidante em diferentes etapas da reação de oxidação, pelos valores de F1 (12) e F2 (13) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

$$(12) F1 = \frac{tg\ amostra\ 30}{tg\ controle\ 30}$$

Onde: tg amostra 30 = tangente da amostra quando x=30 minutos;
 tg controle 30 = tangente do controle quando x=30 minutos.

$$(13) F2 = \frac{tg\ amostra\ 82,5}{tg\ controle\ 82,5}$$

Onde: tg amostra 82,5 = tangente da amostra quando x=82,5 minutos;
 tg controle 82,5 = tangente do controle quando x=82,5 minutos.

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste de ANOVA e o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95%. Para realizar essas análises, foi utilizado o software Sisvar (FERREIRA, 2014).

3.8 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.8.1 Avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*

A toxicidade frente a *Artemia salina* foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com algumas adaptações. Foram testados os extratos brutos, frações e o óleo essencial, e como controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina.

a) Preparo da solução salina

A solução salina foi preparada com 38 g de sal marinho artificial adquirido da empresa Blue Treasure® e 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9 com carbonato de sódio.

b) Eclosão dos ovos

Para a eclosão, 100 mg de ovos de *Artemia salina* foram colocados em 200 mL de solução salina (pH 8-9). Os ovos foram mantidos sob agitação contínua, por 48 horas. Durante esse período, houve a exposição contínua à luz, com o auxílio de uma lâmpada incandescente (40 W), e o controle da temperatura (27 °C a 30 °C).

c) Preparo das amostras e controle positivo

Para as amostras, foi preparada uma solução-mãe de 1 mg/mL em metanol, acrescido de Tween® 80 (1:1).

A partir dessa solução, foram transferidos 0,05; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 mL para frascos de vidro de 10 mL, em quintuplicata. O solvente foi evaporado por 12 h, a 37°C (DALL'STELLA, 2008).

O preparo do sulfato de quinidina foi realizado como descrito para as amostras, sem a adição do Tween 80®.

d) Avaliação da toxicidade

Para avaliar a toxicidade, dez náuplios de *Artemia salina* foram transferidos para os frascos de vidro contendo as amostras ou o controle positivo. Como controle negativo foi utilizado o metanol e metanol acrescido de Tween 80®. O volume de todos os frascos foi ajustado com solução salina para 5 mL, obtendo-se as concentrações de 10, 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Os frascos foram incubados por 24h, a temperatura ambiente. Após esse período, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas. Com os resultados

obtidos, foi realizada a análise estatística pelo método de Probitos, utilizando o software IBM SPSS Statistics® (IBM Corporation, 2013), onde foram determinados os valores de CL₅₀ e intervalos de confiança.

3.8.2 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Banerjee et al. (2008), com algumas modificações. Foram testados os extratos, frações e óleo essencial. Para um melhor entendimento, o relato da técnica será dividido em quatro partes: (a) preparo da solução tampão; (b) preparo do sangue; (c) preparo das amostras e controles positivos; (d) quantificação da atividade hemolítica.

a) Preparo da solução tampão

A solução tampão utilizada neste ensaio foi o tampão fosfato salino (PBS), o qual foi composto de cloreto de sódio (8 g/L), cloreto de potássio (0,2 g/L), fosfato dissódico (1,15 g/L) e fosfato monopotássico (0,2 g/L). Após homogeneização, o pH da solução foi medido (pH ideal: 7,4). O PBS foi armazenado em geladeira e durante todo o experimento foi utilizado e mantido na temperatura de 4°C.

b) Preparo do sangue

Cerca de 3 mL de sangue de carneiro desfibrinado foi centrifugado em tubo falcon por 5 minutos, a 3000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 5 mL de PBS, e o material foi novamente centrifugado nas mesmas condições. O processo de lavagem foi repetido por mais 3 vezes, ou até que o sobrenadante estivesse límpido. Em seguida, com a papa de hemácias resultante, foi preparada uma solução a 2% (m/v) em PBS. A solução foi armazenada em temperaturas próximas de 4°C, para manter a viabilidade das células.

c) Preparo das amostras, padrão e controles positivos

Para as amostras, inicialmente foi preparada uma solução-mãe na concentração de 1 mg/mL. Para a solubilização foi adicionado 0,5% (v/v) de DMSO, 10% (v/v) de metanol, e PBS até completar 10 mL. Em seguida, foram feitas as diluições com PBS, até obter as concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Também foi avaliada a atividade hemolítica de um padrão, para a comparação com os resultados obtidos. Para isso, foi utilizado a saponina preparada como descrito acima, porém utilizando como solvente apenas 10% (v/v) de metanol em PBS.

Como controle positivo foi utilizado o triton e a água potável, os quais serviram como valores de referência para os cálculos descritos posteriormente. O triton foi preparado na concentração de 10 µg/mL em PBS, e a água potável foi utilizada pura.

d) Quantificação da atividade hemolítica

Em um eppendorf, foi adicionado 200 µL de amostra ou controle positivo, seguido de 200 µL da solução de eritrócitos. Também foram feitos controles negativos (PBS no caso do triton, e PBS acrescido de metanol 10% (v/v) e DMSO 0,5% (v/v) no caso das amostras) e um branco para cada concentração, para descontar a cor dos extratos (TABELA 6). O ensaio foi realizado em quadruplicata.

TABELA 6 - QUANTIDADES USADAS DE CADA COMPONENTE NO PREPARO DA SOLUÇÃO DE REAÇÃO NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

	Solução de amostra/ padrão/ controle positivo	PBS/ PBS + Metanol/ PBS + Metanol + DMSO	Solução de eritrócitos
Amostras/ padrão/ controles positivos	200 µL	-	200 µL
Controle negativo	-	200 µL	200 µL
Branco	200 µL	200 µL	-

FONTE: O autor (2018).

Os eppendorfs foram mantidos abertos, e as soluções foram incubadas em estufa com temperatura controlada de 37°C, por 3 horas. Decorrido esse tempo, os eppendorfs foram centrifugados e 150 µL do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços. Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro UV (540 nm).

O cálculo da porcentagem de hemólise para cada concentração foi realizado frente ao triton e a água potável, de acordo com as fórmulas (14) e (15), respectivamente.

$$(14) \% \text{ hemólise} = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{controle\ negativo\ 1} - Abs_{branco\ amostra})}{(Abs_{triton} - Abs_{controle\ negativo\ 2} - Abs_{branco\ triton})} \times 100$$

Onde: $Abs_{amostra}$ = absorbância da amostra;
 $Abs_{controle\ negativo\ 1}$ = absorbância do PBS acrescido de metanol e DMSO;
 $Abs_{branco\ amostra}$ = absorbância do branco da amostra;
 Abs_{triton} = absorbância do triton;
 $Abs_{controle\ negativo\ 2}$ = absorbância do PBS;
 $Abs_{branco\ triton}$ = absorbância do branco do triton.

$$(15) \% \text{ hemólise} = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{controle\ negativo\ 1} - Abs_{branco\ amostra})}{(Abs_{água} - Abs_{branco\ água})} \times 100$$

Onde: $Abs_{amostra}$ = absorbância da amostra;
 $Abs_{controle\ negativo\ 1}$ = absorbância do PBS acrescido de metanol e DMSO;
 $Abs_{branco\ amostra}$ = absorbância do branco da amostra;
 $Abs_{água}$ = absorbância da água potável;
 $Abs_{branco\ água}$ = absorbância do branco da água potável.

A análise estatística foi feita pelo teste de ANOVA e o teste de Tukey, considerando um nível de significância de 95%. Para realizar essas análises, foi utilizado o software Sisvar (FERREIRA, 2014).

3.8.3 Avaliação da atividade fitotóxica

Os extratos brutos e frações foram avaliados de maneira similar, porém com alguns detalhes diferentes em relação ao óleo essencial. Por esse motivo, tais técnicas serão descritas separadamente.

3.8.3.1 Atividade fitotóxica dos extratos brutos e frações

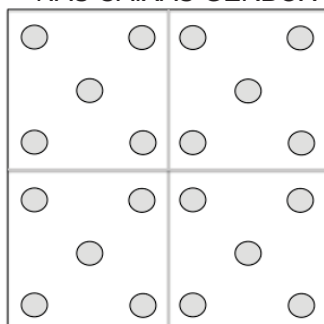
A técnica utilizada para avaliar a atividade fitotóxica foi adaptada das metodologias descritas por Macías, Castellano e Molinillo (2000), Chon et al. (2005) e Dias et al. (2005).

Inicialmente, foram preparadas soluções-mãe de cada amostra, na concentração de 1 mg/mL. Como solvente foi utilizado metanol e, para auxiliar na solubilização, foi adicionado Tween 80[®] na proporção de 1:1 (p/p) em relação ao extrato/fração. A partir da solução-mãe, foram preparadas as diluições em metanol, nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL.

Em caixas gerbox de poliestireno cristal (11 cm x 11 cm x 3,5 cm) foram colocados dois papéis filtros Whatman n.º 6, de tamanho adequado e previamente autoclavados. Em seguida foi adicionado 6 mL da amostra, e o solvente foi evaporado a temperatura ambiente, dentro do fluxo laminar. Foram preparadas duas caixas para cada concentração de cada amostra, referentes a avaliação da germinação e crescimento. Além disso, foram preparadas caixas para o controle negativo (água destilada) e o controle do solvente (metanol acrescido de Tween 80[®]).

Após a evaporação total do solvente, as amostras foram resuspendidas com 6 mL de água destilada. Vinte sementes de *Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids TBR (Feltrin[®]) foram alocadas em cada caixa, de maneira a ficar igual e simetricamente distribuídas em quatro quadrantes (FIGURA 10).

FIGURA 10 – DISPOSIÇÃO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* L., VARIEDADE Grand Rapids TBR NAS CAIXAS GERBOX



FONTE: O autor (2018).

Após a acomodação das sementes, as caixas gerbox foram envoltas com filme plástico e levadas a incubadora BOD (20°C ± 5°C) por 7 dias. Toda a

manipulação das sementes foi realizada em fluxo laminar devidamente higienizado, para evitar a contaminação.

Para a avaliação da germinação, foi feita a leitura diária (durante 7 dias), sempre no mesmo horário, sendo que as sementes germinadas eram retiradas da caixa. Foi calculada a porcentagem de germinação **(16)** e índice de velocidade de germinação (IVG) **(17)**.

$$(16) \% \text{ germinação} = \frac{\text{germinação}_{\text{amostra}}}{\text{germinação}_{\text{controle negativo}}} \times 100$$

Onde: % germinação = germinação, em porcentagem;

germinação_{amostra} = número de sementes germinadas nas caixas de amostra;

germinação_{controle} = número de sementes germinadas nas caixas de água destilada.

$$(17) IVG = \frac{n_1}{1} + \frac{n_2}{2} + \frac{n_x}{x} + \dots + \frac{n_7}{7}$$

Onde: IVG = índice de velocidade de germinação;

n_1 = número de sementes germinadas no dia 1;

n_2 = número de sementes germinadas no dia 2;

n_x = número de sementes germinadas no dia x ;

n_7 = número de sementes germinadas no dia 7.

As caixas referentes ao crescimento foram retiradas da BOD apenas no sétimo dia, quando foram medidos a radícula e o hipocótilo com o auxílio de uma régua e pinça.

Os resultados de porcentagem de germinação, IVG e crescimento de radícula e hipocótilo foram analisados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott, com o auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 2014).

3.8.3.2 Atividade fitotóxica do óleo essencial

Para a avaliação da atividade alelopática (adaptado de SILVA; OVERBECK; SOARES, 2014) do óleo essencial extraído das folhas, foi preparada uma solução-mãe da amostra na concentração de 1% (m/v) em metanol. Para auxiliar na solubilização foi necessário adicionar Tween 80® (na mesma quantidade do óleo). A

partir da solução-mãe, foram feitas as diluições em metanol, até as concentrações de 0,001; 0,01; 0,1 e 1% (m/v).

Nas caixas gerbox (poliestireno de cristal, 11 cm x 11 cm x 3,5 cm) foi colocado um papel filtro Whatman n.º 6 e 5 mL de água destilada. Em seguida, as sementes foram posicionadas na caixa, como previamente descrito (FIGURA 10). Duas folhas de papel filtro foram coladas a tampa da gerbox, onde foi depositado 3 mL da amostra na concentração desejada.

As caixas foram fechadas, envoltas por filme plástico e levadas a incubadora BOD ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) por 7 dias. A contagem da germinação, a medida do crescimento e a análise estatística foi realizada como descrito no item 3.8.3.1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As características morfológicas de espécies contidas no gênero *Ocotea* Aubl. são bastante similares, o que dificulta a diferenciação entre indivíduos deste grupo (SANTOS; OLIVEIRA, 1995). Sendo assim, a descrição das características microscópicas mostra-se de grande valia, uma vez que, aliada a morfologia, auxilia na confirmação da identificação taxonômica.

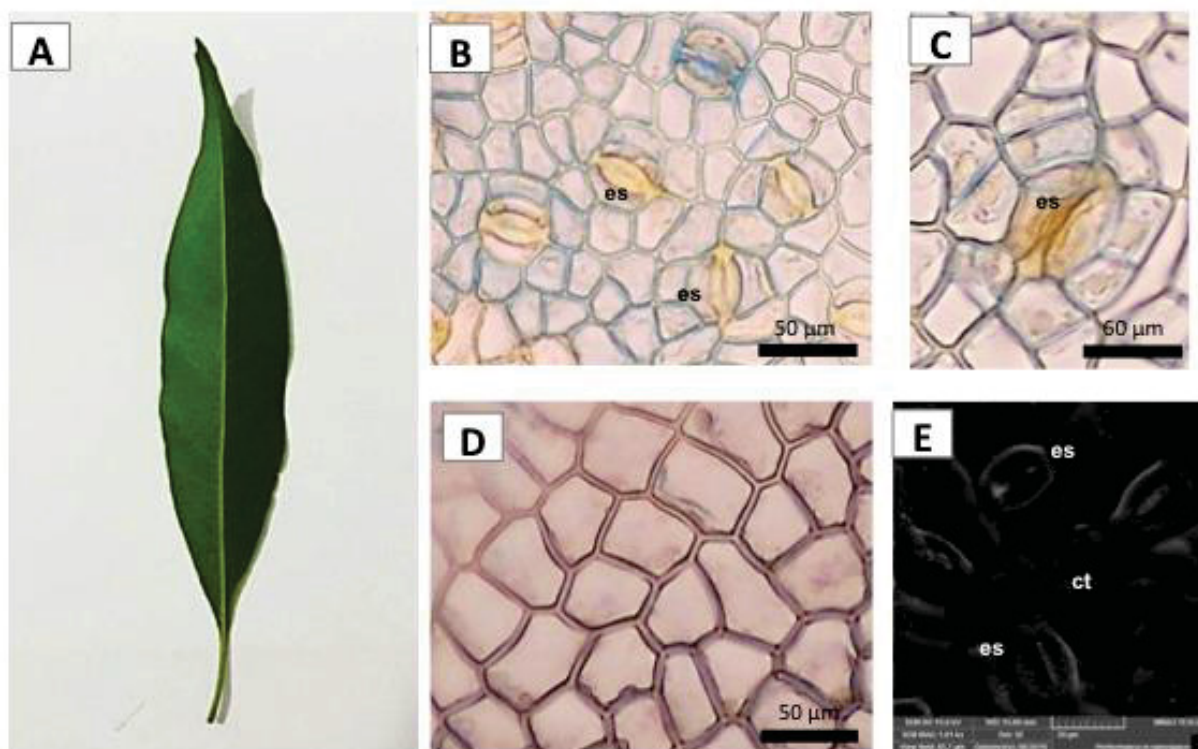
As folhas de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. apresentaram características morfológicas similares às descritas por Brotto, Cervi e Santos (2013). Como pode ser observado na FIGURA 8A, as folhas medem cerca de 6 cm de comprimento e 2 cm de largura; possuem formato elíptico com ápice acuminado, margem ondulada, e ausência de tricomas em ambas as faces (abaxial e adaxial). Sua base é atenuada em pecíolo, o qual mede 1,5 cm e caracterizou-se como canaliculado.

Nas imagens feitas em microscopia óptica foi possível observar, em vista frontal, a presença de células epidérmicas com paredes anticlinais delgadas e retas em ambas as faces.

Também foi possível observar a presença de estômatos apenas na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática. A maior parte dos estômatos encontrados são paracíticos, localizados no mesmo nível das células epidérmicas (FIGURA 11B), embora também ocorram estômatos actinocíticos em menor número (FIGURA 11C).

Os estômatos paracíticos são acompanhados, de cada lado, por uma ou mais células subsidiárias, posicionadas de forma que o seu eixo longitudinal fica paralelo à fenda estomática (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Esse tipo de estômato é amplamente descrito no gênero *Ocotea* Aubl. (METCALFE; CHALK, 1987).

FIGURA 11 – VISTA FRONTAL DA EPIDERME FOLIAR DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.



FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) **A**: Folha em face abaxial; **B e C**: Face abaxial em microscopia óptica evidenciando estômatos; **D**: Face adaxial em microscopia óptica; **E**: Face abaxial em microscopia eletrônica de varredura (MEV); (2) estômato (es); cutícula (ct).

Ainda em relação as folhas, foi observado na superfície da parede celular epidérmica uma camada de material lipofílico, denominado cutícula, a qual mostrou-se espessa e lisa em ambas as faces (FIGURA 12C e D). Além disso, esse material reagiu positivamente ao Sudam III no teste histoquímico, assim como em *O. nutans* (Nees) Mez (BETIM, 2016). A cutícula atua na proteção contra agentes patogênicos, proporciona proteção mecânica e evita a perda de água (CUTTER, 1986, FANINI; LABBÉ; COLL, 1999, RIEDERER; SCHEREIBER; 2001).

Ainda que a presença de tricomas seja comum em Lauraceae (FAHN, 1990), como é o caso da *O. puberula* (Rich.) Nees (FARAGO et al., 2005), a espécie *O. diospyrifolia* (Meisn.) Mez. não apresentou tricomas glandulares ou tectores. A ausência dessa estrutura também foi observada para a *O. nutans* (Nees) Mez. (BETIM, 2016) e *O. gardneri* (Meisn.) Mez. (COUTINHO et al., 2006a).

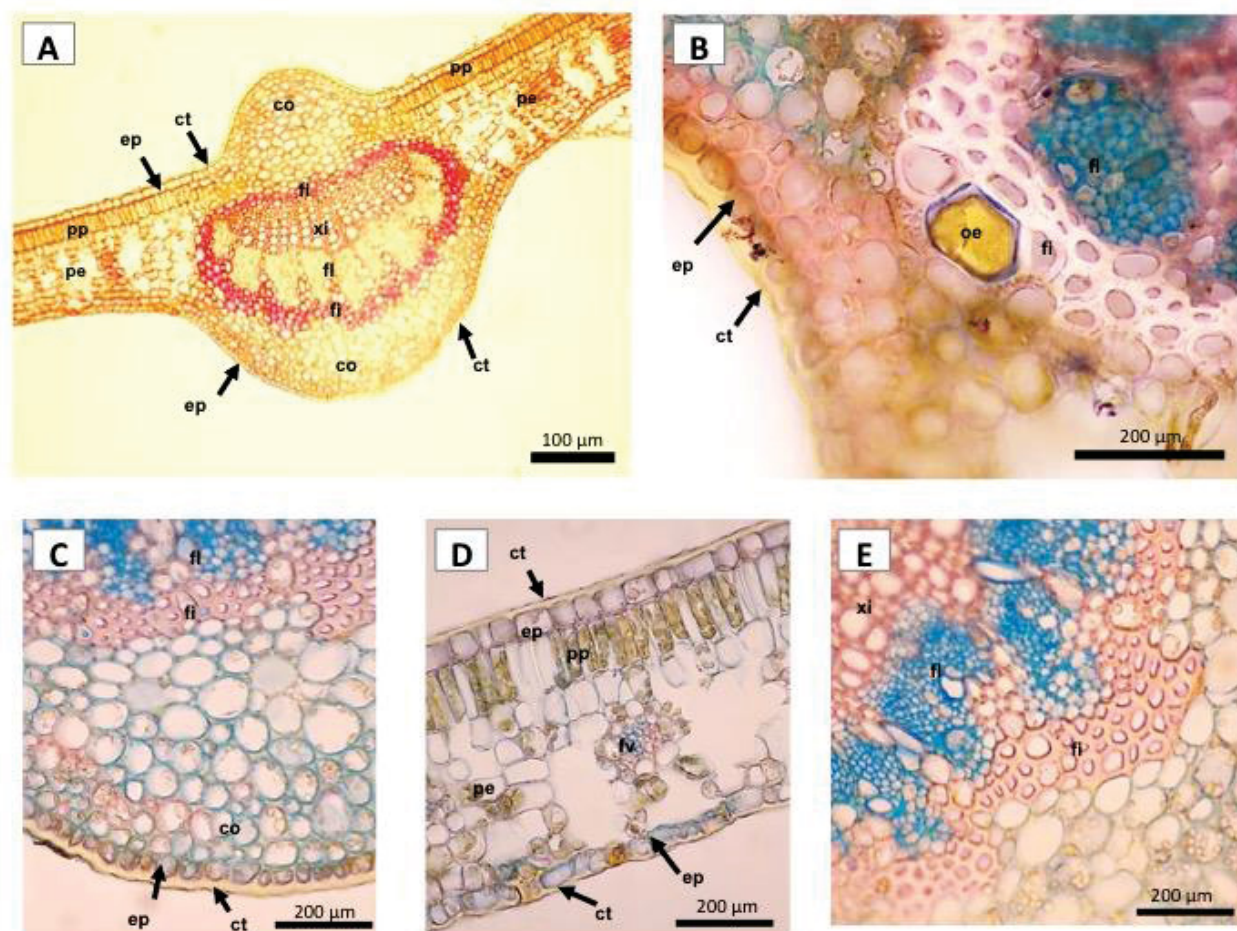
Nas imagens de secção transversal (FIGURA 12), é possível observar um mesofilo dorsiventral, formado por uma camada de parênquima paliçádico, seguido de seis camadas de parênquima esponjoso. Essa descrição vai de encontro ao relatado

para *O. bicolor* Vattimo-Gil (DAMASCENO, 2017), *O. puberula* (Rich.) (FARAGO et al., 2005) e *O. duckei* Vattimo (COUTINHO et al., 2006b), visto que o mesofilo do tipo dorsiventral é comumente identificado em espécies de Lauraceae (METCALFE; CHALK, 1972). Porém, opondo-se ao descrito para a espécie em estudo, *O. gardneri* (Meisn.) Mez. evidenciou mesofilo do tipo isobilateral (COUTINHO et al., 2006a). Diferente do relatado para *O. bicolor* (DAMASCENO, 2017) e *O. nutans* (BETIM, 2016), a espécie em estudo não apresentou células secretoras de substâncias de natureza mucilagínosa dispersas no mesofilo.

Também pode-se perceber, em secção transversal, o formato biconvexo da nervura central (FIGURA 12A), característica já encontrada em outras ocoteas (DAMASCENO, 2017, FARAGO et al., 2005, COUTINHO et al., 2006a, COUTINHO et al., 2006b). O sistema vascular é formado por um feixe único e colateral, onde o floema está voltado para a periferia da folha, e o xilema localiza-se no centro (FIGURA 12A). Todo o sistema vascular está envolvido por uma densa bainha de fibras esclerenquimáticas (FIGURA 12B e E), as quais reagiram positivamente com floroglucina clorídrica nos testes histoquímicos. Inserido na bainha, observou-se a presença de células secretoras de conteúdo lipofílico (FIGURA 12B).

Em relação a epiderme foliar, observou-se uma estrutura unisseriada com células de formato regular (isodiamétricas) em ambas as faces (FIGURA 12A, C e D). Subjacente à epiderme, foi possível notar camadas de colênquima do tipo angular (FIGURA 12A e C).

FIGURA 12 – SECÇÃO TRANSVERSAL DA FOLHA DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. EM MICROSCOPIA ÓPTICA



FONTE: O autor (2018).

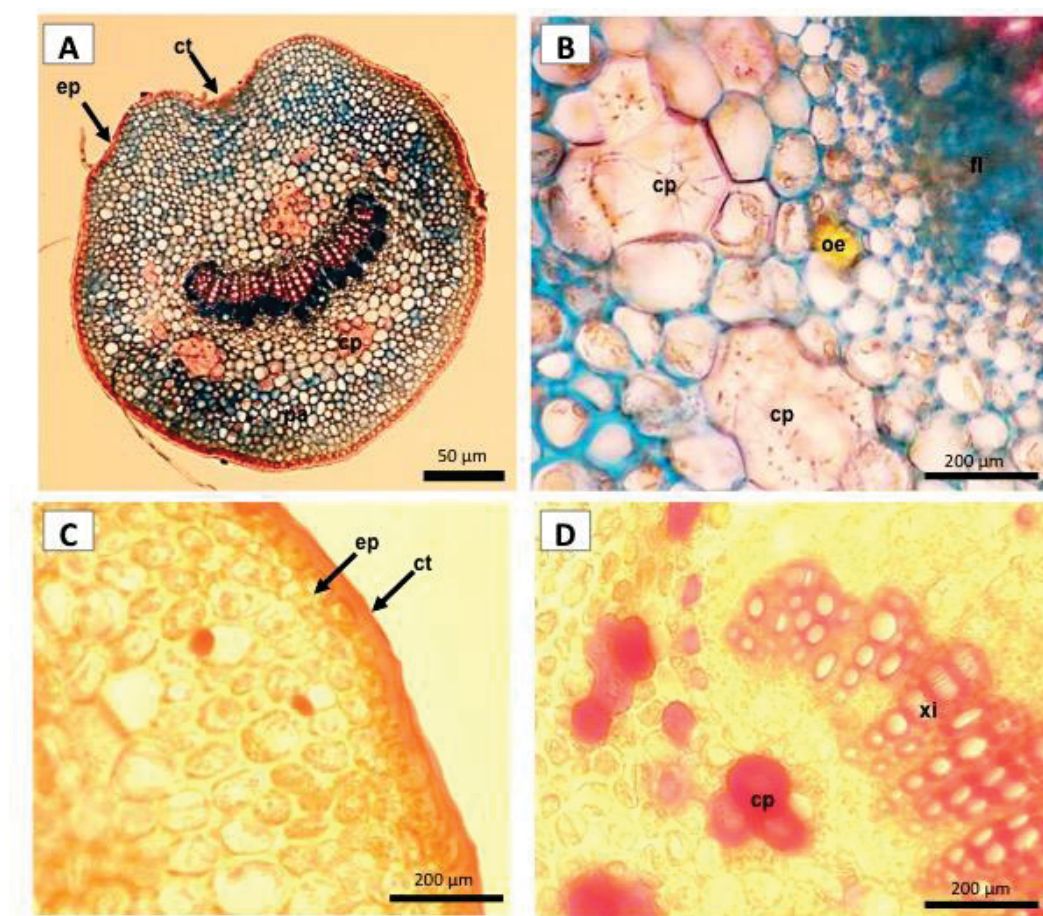
NOTA: (1) **A**: Visão geral da secção transversal; **B**: Detalhe para a célula secretora de óleo essencial; **C**: Detalhes do colênquima; **D**: Detalhes do mesofilo; **E**: Detalhes do feixe vascular; (2) colênquima (co); cutícula (ct); epiderme (ep); fibras (fi); floema (fl); feixe vascular (fv); óleo essencial (oe); parênquima esponjoso (pe); parênquima paliçádico (pp); xilema (xi).

As características do pecíolo em corte transversal podem ser visualizadas na FIGURA 13. Na imagem, pode-se observar seu formato côncavo-convexo (FIGURA 13A), divergente do descrito para as espécies *O. nutans* (BETIM, 2016) e *O. bicolor* (DAMASCENO, 2017), que apresentaram um pecíolo plano-convexo. Sua epiderme é uniestratificada e revestida por cutícula espessa e lisa, a qual reage positivamente com Sudam III (FIGURA 13D). Tais características também foram verificadas na epiderme do pecíolo de *O. gardneri*, *O. puberula*, *O. duckei* (FARAGO et al., 2005; COUTINHO et al., 2006a; COUTINHO et al., 2006b).

Ainda, foi relatada a presença de tricomas tectores uniseriados, porém escassos, como evidenciado por Santos e Oliveira (1995).

No parênquima fundamental observou-se a presença de células irregulares, destacando-se grupos de células pétreas (FIGURA 13A, B e D) e células oleíferas (FIGURA 13B). Assim como nas folhas, o feixe vascular apresentou-se colateral, único e central. Além disso, tal feixe está disposto em arco aberto, como já descrito por Santos e Oliveira (1995) para algumas espécies de *Ocotea*, incluindo a *O. diospyrifolia*.

FIGURA 13 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO PECÍOLO DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. EM MICROSCOPIA ÓPTICA



FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) **A**: Visão geral do pecíolo; **B**: Detalhes das células pétreas e célula secretora de óleo essencial; **C**: Cutícula em reação com sudam III; **D**: Reação com floroglucina clorídrica (2) célula pétrea (cp); epiderme (ep); fibras (fi); floema (fl); óleo essencial (oe); parênquima (pa); xilema (xi).

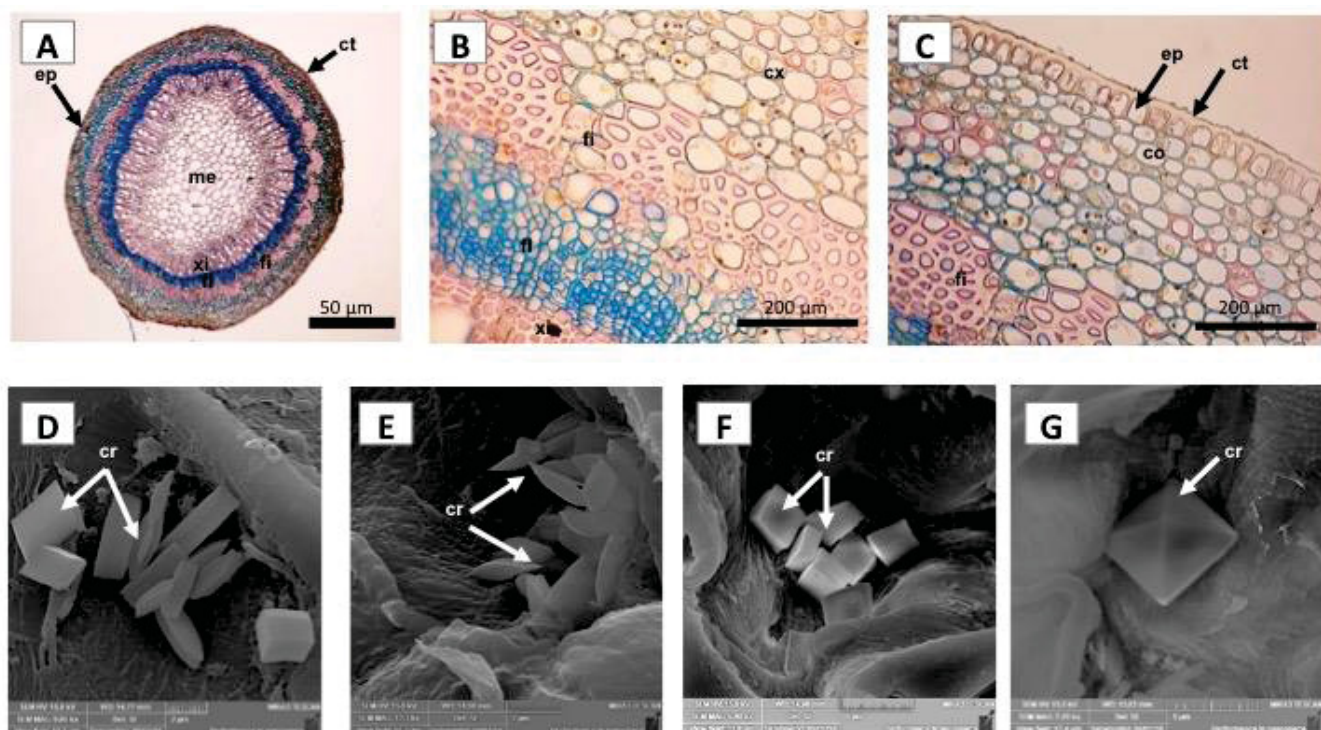
Por sua vez, o galho evidenciou formato circular assim como em *O. nutans* e *O. bicolor*. (FIGURA 14A) (BETIM, 2016, DAMASCENO, 2017). A epiderme também se mostrou uniestratificada, sendo formada por células alongadas no sentido periclinal e revestidas por espessa cutícula evidenciada por Sudam III (FIGURA 14C). Logo abaixo da epiderme, encontra-se o colênquima do tipo angular.

No córtex caulinar são observadas células esclerenquimáticas isoladas ou em grupos, as quais reagiram positivamente à floroglucina clorídrica. Diferente do verificado para *O. nutans* e *O. bicolor* (BETIM, 2016, DAMASCENO, 2017), não foram visualizadas células contendo substâncias fenólicas.

A zona cambial é evidente, e o cilindro vascular colateral é circundado por uma bainha esclerenquimática. Não foram observadas células pétreas ou braquiesclereides, diferente do relatado por Santos e Oliveira (1995).

A região medular apresenta células grandes com paredes delgadas, no entanto com maior volume medular quando comparado a *O. nutans* (BETIM, 2016). Grãos de amido foram observados no córtex e na região perimedular. Além disso, cristais de oxalato de cálcio com os mais variados formatos encontram-se na região perimedular. Segundo Nakata (2003), essas substâncias exercem importantes papéis na espécie vegetal como proteção contra herbivoria, regulador de cálcio e podem atuar como agente desintoxicante.

FIGURA 14 - SECÇÃO TRANSVERSAL DO GALHO DA ESPÉCIE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. EM MICROSCÓPIA ÓPTICA (MO) E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)



FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) **A**: Visão geral do galho em MO; **B**: Detalhes do feixe vascular em MO; **C**: Detalhes do colênquima em MO; **D, E, F e G**: Cristais de oxalato de cálcio na região medular em MEV; (2) cristais (cr); córtex (cx); epiderme (ep); fibras (fi); floema (fl); xilema (xl).

Tendo em vista as características observadas no estudo morfológico, é possível preceber que algumas delas auxiliam na diferenciação dentro do gênero *Ocotea*, condizendo com o descrito por Brotto, Cervi e Santos (2013). Dentre essas particularidades, pode-se citar a ausência de tricomas nas folhas, aliado ao comprimento do pecíolo (aproximadamente 1,5 cm).

Ainda, nas análises microscópicas das folhas, destacou-se a presença de raros estômatos actinocíticos, células oleíferas, e ausência de células secretoras de mucilagem. Para o pecíolo, as características evidenciadas foram o formato côncavo-convexo, a presença de escassos tricomas tectores e de células de óleo essencial. Já o galho foi caracterizado principalmente pela ausência de compostos fenólicos em ensaios histoquímicos.

4.2 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados dos teores de umidade e cinzas do material utilizado para o preparo dos extratos podem ser visualizados na TABELA 7. Tais ensaios foram realizados no intuito de avaliar parâmetros de qualidade das folhas e galhos secos.

TABELA 7 – RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DO TEOR DE UMIDADE (%) E CINZAS TOTAIS (%) NAS FOLHAS E GALHO DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez.

	Umidade (%)	Cinzas (%)
Folhas	14,98 ± 0,16	3,53 ± 0,03
Galho	17,27 ± 0,29	2,82 ± 0,06

Fonte: O autor (2018).

No ensaio de cinzas totais ocorre a combustão das substâncias orgânicas, restando apenas os resíduos não voláteis (COSTA; 2001). Tal material pode ser proveniente dos constituintes minerais e de substâncias organo-metálicas presentes no vegetal (cinzas fisiológicas), ou de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderida a superfície da droga (cinzas não fisiológicas) (COSTA; 2001, ANVISA, 2010). Tendo isso em vista, os valores obtidos neste ensaio podem fornecer informações sobre a contaminação da amostra.

A espécie *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. não possui monografia na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. Porém, três drogas vegetais presentes nesse compêndio pertencem a família Lauraceae, sendo elas: *Persea americana* Mill. (folhas

secas), *Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl (casca seca), *Cinnamomum verum* J. Presl. (casca seca). Tomando como base tais espécies, o teor de cinzas não deve ultrapassar 5% (ANVISA, 2010); sendo assim, os valores de $(3,53 \pm 0,03)\%$ para as folhas, e $(2,82 \pm 0,06)\%$ para o galho estão dentro do recomendado para a família.

Em relação a umidade, o único dado sobre a família encontrado na Farmacopéia Brasileira 5 ed. foi da *Persea americana* Mill., onde o valor máximo permitido é de 12%. A partir disso, pode-se dizer que os teores de umidade obtidos estão acima do desejado.

No controle de qualidade de drogas vegetais comercializadas, o excesso de umidade nas amostras favorece o desenvolvimento de microrganismos, além de estimular a ação de enzimas que podem degradar os constituintes químicos (OLIVEIRA; AKISUE, 1991, VON HERTWIG, 1991). Como o material coletado foi seco e logo em seguida moído e colocado no extrator, o teor de umidade provavelmente não alterou a composição fitoquímica.

É importante ressaltar que as referências para os teores de umidade e cinzas aqui citados não são específicos para a *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez., portanto os resultados obtidos seriam novos. Ainda assim, não se deve usar esses resultados como absolutos para definir parâmetros de qualidade, mas sim tomá-los como base no sentido de contribuir com a definição de um real parâmetro, o qual deve levar em consideração amostras coletadas de diferentes locais e épocas do ano.

4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

A análise fitoquímica preliminar evidenciou a presença de alcaloides, cumarinas, iridoides e triterpenos no extrato hidroalcoólico, como pode ser visto na TABELA 8.

TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS E GALHO DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez.

Metabólito	Folha				Galho			
	EH	FH	FC	FA	EH	FH	FC	FA
Alcaloides	+	-	+	-	+	-	+	-
Flavonoides	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	+	-	+	-	+	-	+	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides/triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (+) = positivo; (-) = negativo; EH = Extrato hidroalcoólico; FH = Fração hexano; FC = Fração clorofórmio; FA = Fração acetato de etila.

Além disso, foram detectados metabólitos como saponinas, polifenóis e substâncias com grupo amino no extrato aquoso (TABELA 9).

TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS E GALHO DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez.

Metabólito	Folha	Galho
Heterosídeos antociânicos	-	-
Heterosídeos saponínicos	+	+
Heterosídeos cianogênicos	-	-
Polifenóis	+	+
Taninos	-	-
Substâncias com grupo amino	+	+
Ácidos voláteis	-	-
Ácidos fixos	-	-

FONTE: o autor (2018).

NOTA: (+) = positivo; (-) = negativo.

Os resultados obtidos condizem com o descrito na literatura em relação a composição fitoquímica do gênero *Ocotea* Aubl. Foram encontrados relatos da presença de alcaloides (ZANIN; LORDELLO, 2007, MONTRUCCHIO et al, 2012, SALLEH; AHMAD, 2017) esteroides (GARCEZ et al., 2005, SALLEH; AHMAD, 2017) cumarinas e saponinas (SALLEH; AHMAD, 2017).

4.4 ESTUDO FITOQUÍMICO

A partir dos extratos brutos obtidos por Soxhlet, foi calculado o rendimento de tais materiais em relação a quantidade de material seco, com base na quantificação de sólidos

Para o extrato bruto das folhas, o teor de sólidos obtido foi de $(2,51 \pm 0,02)$ g/100mL, e o rendimento foi de 8,86%. Na extração dos galhos o teor de sólidos foi de $(1,12 \pm 0,00)$ g/100 mL, e o rendimento foi de 3,14%.

Ambos os extratos foram particionados em Soxhlet, e o rendimento de cada fração, em relação a quantidade de planta seca utilizada, pode ser visto na TABELA 10. Tais rendimentos também foram calculados em relação a quantidade de material seco utilizada.

TABELA 10 – RENDIMENTO DO FRACIONAMENTO DAS FOLHAS E GALHOS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

	Fração	Quantidade obtida (g)	Rendimento (%)
Folha	Hexano	62,85	3,85
	Clorofórmio	12,99	0,80
	Acetato de etila	3,26	0,20
	Remanescente	45,58	2,80
Galho	Hexano	11,79	0,36
	Clorofórmio	27,73	0,84
	Acetato de etila	3,59	0,11
	Remanescente	25,48	0,77
	Etanol	8,19	0,25

FONTE: o autor (2018).

Para acompanhar o processo de separação dos compostos, foram feitas cromatografias em camada delgada, onde foi possível evidenciar a presença de determinados grupamentos químicos. Como pode ser visto na TABELA 11, foram detectados flavonoides, cumarinas e esteroides/triterpenos em pelo menos duas das amostras provenientes das folhas, exceto na fração remanescente. Nos extratos e frações dos galhos, as substâncias foram detectadas em pelo menos três amostras cada. Os alcaloides não foram detectados em nenhuma das amostras testadas.

TABELA 11 – RESULTADOS OBTIDOS NA BUSCA POR ALCALOIDES, FLAVONOIDES, CUMARINAS E ESTEROIDES E TRITERPENOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. UTILIZANDO CCD

Metabólito	Folha					Galho					
	EB	FH	FC	FA	FR	EB	FH	FC	FA	FR	FE
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Esteroides/ triterpenos	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-

FONTE: o autor (2018).

NOTA: (1) + : positivo; - : negativo; (2) EB: Extrato bruto; FH: Fração hexano; FC: Fração clorofórmio; FA: Fração acetato; FR: Fração remanescente; FE: Fração etanol.

Comparado com o ensaio fitoquímico preliminar realizado anteriormente, é possível observar algumas diferenças em relação a composição dos extratos. Os resultados do estudo fitoquímico preliminar não evidenciaram a presença de flavonoides, e foram positivos para alcaloides. O oposto aconteceu nas cromatografias em camada delgada, onde não foram detectados alcaloides, e a presença de flavonóides foi observada em quase todas as amostras.

Uma das possíveis explicações é o fato de que partiu-se de métodos extrativos diferentes. Os extratos da macha fitoquímica foram obtidos por maceração, e o

fracionamento foi feito a frio, em funil de separação. Já os extratos utilizados na pesquisa por CCD foram produzidos e fracionados em Soxhlet.

A utilização do Soxhlet traz a vantagem de extrair uma quantidade maior de material, visto que o vegetal entra em contato com o solvente destilado inúmeras vezes (CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998, CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Sendo assim, uma quantidade maior de flavonoides foi extraída pelo Soxhlet, o que poderia explicar a positividade dos flavonoides na cromatografia.

Por outro lado, sabe-se que no Soxhlet a extração ocorre na temperatura de ebulição do solvente por um longo período de tempo, o que pode acarretar em decomposição térmica de alguns compostos (CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998, CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010). Logo, existe a possibilidade de durante o procedimento parte dos alcaloides ter sido degradado, o que não aconteceu na extração por maceração.

Ainda, deve-se levar em consideração a diferença de sensibilidade entre as metodologias de detecção utilizadas (reações colorimétricas ou de precipitação em tubos de ensaio e cromatografia em camada delgada). É possível que os alcaloides estivessem presentes em uma baixa concentração, a qual foi detectada pelo estudo fitoquímico preliminar, mas não pelo análise por CCD.

A diminuição na quantidade de alcaloides nas folhas e galhos pode ser consequência de influências sazonais, perda por lixiviação e estágio de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). No caso do presente trabalho, é interessante citar que a coleta foi realizada durante a frutificação da espécie, onde foi observada a formação de galhas nos frutos.

As galhas são alterações estruturais (hiperplasia e hipertrofia) em determinados órgãos vegetais (MANI, 1964), que podem ser induzidas por diversos organismos como fungos, bactérias, insetos (DARLINGTON; HIRONS, 1975). Essas modificações nos tecidos podem ser acompanhadas de alterações na produção de metabólitos, sejam primários ou secundários (HARTLEY, 1998), que decorrem de mecanismos de defesa e adaptação desenvolvidos pela planta (OLIVEIRA et al., 2006). Assim, é possível que tenha ocorrido uma intensificação na produção de alcaloides nos frutos galhados, diminuindo a sua quantidade nos demais órgãos (folhas e galhos).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE CLOROFILAS E CAROTENOIDES

A concentração ($\mu\text{g}/\text{mg}$) de clorofila a, clorofila b, licopeno e β -caroteno nos extratos brutos e frações hexano pode ser vista na TABELA 12. Tendo em vista a atividade antioxidante apresentada por esses compostos (STREIT et al., 2005; SILVA et al., 2010), suas quantificações foram realizadas no intuito de identificar uma possível fonte dessas substâncias.

TABELA 12 – CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA a, CLOROFILA b, LICOPENO E β -CAROTENO EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

Amostra	Clorofila a ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Clorofila b ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Licopeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	β -caroteno ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Extrato bruto – folhas	$24,05 \pm 2,14$	$6,57 \pm 1,05$	$2,42 \pm 0,25$	$2,63 \pm 0,35$
Fração hexano – folhas	$30,72 \pm 1,60$	$4,90 \pm 0,29$	$2,95 \pm 0,16$	$4,71 \pm 0,36$
Extrato bruto – galhos	$2,99 \pm 0,74$	$4,52 \pm 1,11$	$0,69 \pm 0,12$	Não detectado
Fração hexano – galhos	$5,54 \pm 0,11$	$0,89 \pm 0,07$	$0,56 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,02$

FONTE: o autor (2018).

O conteúdo de clorofila nas plantas pode variar amplamente, dependendo do seu acesso à luz, estado fisiológico e condições ambientais (BOJOVIĆ; STOJANOVIĆ, 2005), como o nível de poluição (INOUE, 2009).

Tendo em vista que o principal órgão fotossintético são as folhas, é previsível que a maior quantidade de clorofila total (a+b) seria encontrado nessa parte da planta, quando comparado com o galho.

Em comparação com a *Ocotea puberula*, o valor de clorofila total obtido se mostrou menor. Foi realizada uma avaliação mensal e, no mês de abril (mês em que a *Ocotea diospyrifolia* foi coletada), a *O. puberula* apresentou $4,36 \mu\text{g}/\text{mg}$ de planta (INOUE, 2009). Já na *O. diospyrifolia* foi quantificado $2,71 \mu\text{g}$ de clorofila total por mg de planta, valor cerca de 1,7 vezes menor. Isso se dá, provavelmente, pela diferença de condições ambientais em que as espécies estão inseridas.

Os carotenos avaliados neste ensaio (β -caroteno e licopeno) são classificados como carotenoides hidrocarbonetos (SILVA et al., 2010). O licopeno é um isômero acíclico do β -caroteno (SILVA et al., 2010), e ambos possuem um sistema de 11 ligações conjugadas, responsável pela sua capacidade de absorver a luz (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004). Essas ligações conjugadas também conferem a essas moléculas propriedade antioxidante (UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007; SILVA et al., 2010).

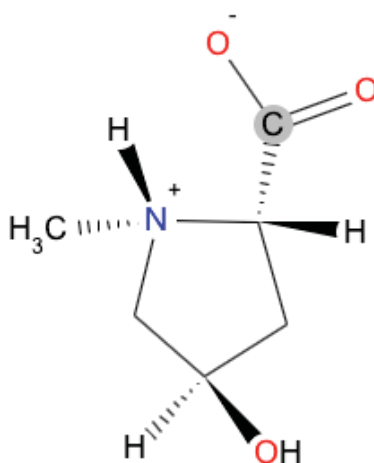
Nas plantas, os carotenos atuam na fotoproteção e no auxílio da captura de luz para a clorofila (DEMMIG-ADAMS; GILMORE; ADAMS III, 1996; STREIT et al., 2005). Assim, faz sentido que a quantidade mensurada de carotenos tenha acompanhado a quantidade de clorofila, sendo maior no extrato bruto e fração hexano das folhas.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

A partir dos procedimentos de separação descritos no item 3.4.6.1 obteve-se um cristal incolor. O material foi enviado para cristalografia, onde a célula unitária apresentou as seguintes características: sistema cristalino monoclinico P (α e $\gamma = 90^\circ$; $\beta = 100,87^\circ$), com dimensões de 6,74 Å x 5,85 Å x 8,88 Å, e volume de 343 Å³.

A partir da comparação com o banco de dados do Cambridge Crystallographic Data Centre, pode-se propor a estrutura apresentada na FIGURA 15, denominada 4-hidróxi-N-metilprolina (C₆H₁₁O₃N).

FIGURA 15 – ESTRUTURA DA 4-HIDRÓXI-N-METILPROLINA



FONTE: Adaptado de Yapp, Steed e Houghton (2002).

Trata-se de um hidro-aminoácido cíclico, e sua presença no gênero *Ocotea* e na família Lauraceae foi relatada, até o momento, apenas para a espécie *Ocotea caudata* (Nees) Mez. (ARCHILA; SUARÉZ, 2017).

Quanto a sua função nas plantas, algumas espécies halófitas aparentam acumular derivados da prolina, entre eles a 4-hidróxi-N-metilprolina, o que parece contribuir com a resistência ao estresse salino (NAIDU et al., 1987).

Do ponto de vista das atividades biológicas, o composto demonstrou ter ação antibacteriana contra três cepas, inibindo mais de 70% do crescimento de *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Lactobacillus lactis*, em uma concentração de 16 µg/mL (JAIN et al., 2006).

A substância também foi testada por Dekebo et al. (2007) quanto a sua capacidade de inibir a ovoposição de *Liriomyza trifolii* (Burgess) em folhas de feijão cavalo. O inseto em questão costuma causar danos às folhas de diversos vegetais, incluindo o tomate, pepino, alface, pimenta e melão (DOGIMONT et al., 1998). Quando espalhada sobre as folhas do feijão, a solução de 4-hidróxi-N-metilprolina (16,6 µg/cm²) diminuiu em aproximadamente 74% a desova do inseto (DEKEBO et al., 2007).

Ainda, ensaios realizados em modelos animais mostraram que a 4-hidróxi-N-metilprolina, dentre outros derivados da prolina, é capaz de potencializar a atividade anticonvulsivante da vigabatrina, e possivelmente de grande parte dos agentes GABA-miméticos (SARHAN; SEILER 1989).

4.7 ÓLEO ESSENCIAL

Para a obtenção do óleo essencial, foram realizadas duas coletas, em períodos distintos. A primeira delas, feita durante o verão (março/2016), gerou 0,35 mL de óleo essencial, equivalente a um rendimento de 0,05%. O material obtido (OE1) apresentou um odor forte e coloração escura.

Como a quantidade de óleo obtida foi insuficiente para a realização das atividades biológicas, foi necessário realizar uma nova coleta e extração. Essa segunda extração foi feita com o material coletado durante o inverno (julho/2017), e apresentou um rendimento superior, de 0,21% (OE2). Diferente do OE1, este óleo apresentou coloração amarela clara e odor mais suave.

A TABELA 13 traz o rendimento da extração a partir das folhas de algumas espécies do gênero *Ocotea*. Como pode ser visto, mesmo o OE2 apresentou um rendimento menor quando comparado a maioria das espécies apresentadas.

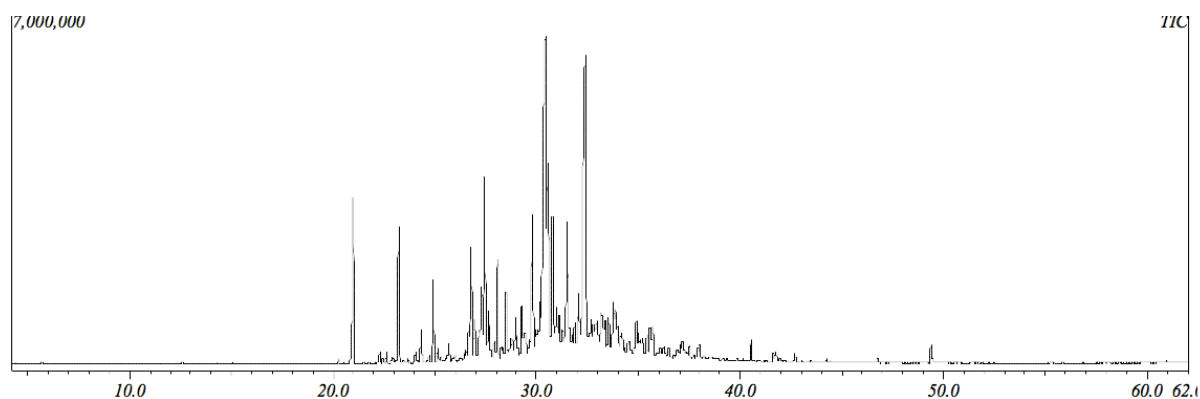
TABELA 13 – RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE ESPÉCIES DE OCOTEA

Espécie	Rendimento (m/v)	Referência
<i>Ocotea nutans</i> (Nees) Mez	0,54%	Betim, 2016
<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rowher	1,2%	Cansian et al., 2010
<i>Ocotea bicolor</i> Vattimo-Gil	3,2%	Damasceno, 2017
<i>Ocotea nonata</i> (Nees) Mez	0,12%	Garret et al., 2010

FONTE: O autor (2018).

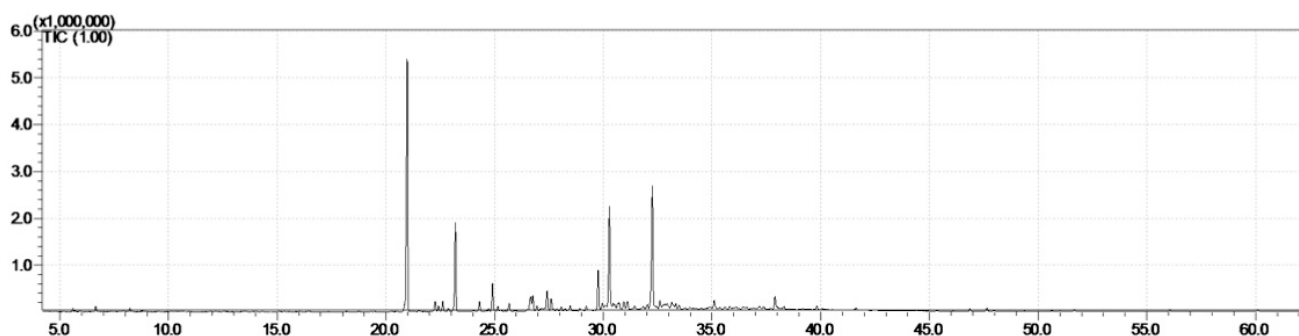
A diferença de rendimento em diferentes épocas do ano também foi observada para a *Ocotea odorifera* Vell.; porém a produção nessa espécie foi maior no verão quando comparada ao inverno (CASTELLANI et al., 2006). Um detalhe importante no caso da *O. diospyrifolia* é a sua época de floração, que vai de agosto a dezembro (BROTTO; CERVI; SANTOS, 2013). Como a segunda coleta foi realizada logo antes desse período, essa pode ser uma das razões para o aumento no rendimento do óleo essencial. Inclusive, existem recomendações de que a coleta das folhas seja feita antes da floração, para otimizar a extração do óleo (MARTINS et al., 1994). Ainda, o rendimento mais baixo obtido durante o verão pode ser consequência das temperaturas mais altas, que facilitam a evaporação dos compostos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Porém, tais fatos são apenas hipóteses, já que a regulação da produção de óleo essencial é complexa, e depende de diversos fatores ambientais e da própria planta, os quais muitas vezes atuam em conjunto (SANGWAN et al., 2001, GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As duas amostras de óleo essencial (OE1 e OE2) foram enviadas para análise por CG-EM, porém as atividades foram avaliadas apenas com o material coletado no inverno. Os cromatogramas podem ser vistos nas FIGURAS 16 e 17, e a composição está descrita na TABELA 14.

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DE ANÁLISE POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. COLETADAS EM ABRIL/2016

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DE ANÁLISE POR CG-EM DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. COLETADAS EM JULHO/2017



FONTE: O autor (2018).

TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. COLETADAS NO VERÃO (OE1) E INVERNO (OE2)
(continua)

IA	IA teórico	Composto	[] %		Classificação
			OE1	OE2	
928	932	α -Pineno	-	0,2	Monoterpeno bicíclico
967	974	β -Pineno	-	0,37	Monoterpeno bicíclico
1019	1024	Limoneno	-	0,26	Monoterpeno monocíclico
1330	1335	δ-Elemeno	3,99	25,93	Sesquiterpeno monocíclico
1360	1374	Isoledeno	-	1,03	Sesquiterpeno bicíclico
1363	1373	α -Ylangeno	-	0,49	Sesquiterpeno bicíclico
1369	1374	α -Copaeno	0,22	1,00	Sesquiterpeno bicíclico
1375	1387	β -Bourboneno	0,20	-	Sesquiterpeno tricíclico
1382	1389	β -Elemeno	2,80	9,49	Sesquiterpeno monocíclico
1402	1428	(E)- α -Ionona	0,21	-	Outro
1407	1408	(Z)-Cariofileno	-	1,08	Sesquiterpeno bicíclico
1408	1417	(E)-Cariofileno	0,73	-	Sesquiterpeno bicíclico
1417	1430	β -Copaeno	-	0,26	Sesquiterpeno bicíclico
1423	1434	γ -Elemeno	1,70	2,86	Sesquiterpeno monocíclico
1427	1439	Aromadendreno	-	0,54	Sesquiterpeno tricíclico
1431	1442	6,9-Guaiadieno	0,15	-	Sesquiterpeno bicíclico
1441	1452	α -Humuleno	0,44	0,92	Sesquiterpeno monocíclico
1459	1487	(E)- β -Ionona	0,19	-	Outro
1461	1489	β -Selineno	0,22	-	Sesquiterpeno bicíclico
1463	1458	allo-Aromadendreno	0,14	1,92	Sesquiterpeno tricíclico
1464	-	NI	0,83	-	-
1466	1478	γ -Muuroleno	-	1,70	Sesquiterpeno bicíclico
1467	1480	Germacreno D	2,61	-	Sesquiterpeno monocíclico
1471	-	NI	0,68	0,53	-
1472	-	NI	0,64	-	-
1477	-	NI	0,75	-	-
1480	1493	Epi-cubebol	2,05	-	Álcool sesquiterpênico tricíclico
1482	1500	Biclogermacreno	4,47	2,19	Sesquiterpeno bicíclico
1486	1500	α -Muuroleno	1,18	1,26	Sesquiterpeno bicíclico
1489	1506	(Z)- α -Bisaboleno	0,17	-	Sesquiterpeno monocíclico
1494	1513	γ -Cadineno	0,44	-	Sesquiterpeno bibíclico

TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. COLETADAS NO VERÃO (OE1) E INVERNO (OE2) (continuação)

IA	IA teórico	Composto	[] %		Classificação
			OE1	OE2	
1497	1495	γ -Amorfenol	-	0,39	Sesquiterpeno bicíclico
1498	1514	Cubebol	2,26	-	Álcool sesquiterpênico tricíclico
1503	1521	trans-Calameneno	0,23	-	Sesquiterpeno bicíclico
1508	1511	δ -Amorfenol	-	0,49	Sesquiterpeno bicíclico
1509	1522	δ -Cadineno	1,49	-	Sesquiterpeno bicíclico
1514	1538	Fulopelargona A	0,37	-	Sesquiterpeno bicíclico oxigenado
1516	-	-	0,46	-	-
1520	1544	α -Calacoreno	0,98	-	Sesquiterpeno bicíclico
1526	1546	Hediciol	-	0,54	Álcool sesquiterpênico monocíclico
1528	1548	Elemol	1,46	-	Álcool sesquiterpênico monocíclico
1532	-	NI	0,84	-	-
1540	1559	Germacreno B	3,60	4,36	Sesquiterpeno monocíclico
1553	1577	Espatuleno	16,4	11,4	Álcool sesquiterpênico bicíclico
1560	1582	Óxido de cariofileno	6,44	-	Sesquiterpeno bicíclico oxigenado
1564	-	NI	-	0,67	-
1566	-	NI	4,01	-	-
1569	-	NI	-	0,75	-
1571	1600	Guaiol	1,40	-	Álcool sesquiterpênico bicíclico
1573	-	NI	-	0,99	-
1574	-	NI	1,09	-	-
1578	-	NI	0,73	-	-
1584	1608	Humuleno epóxido II	3,54	-	Sesquiterpeno monocíclico oxigenado
1590	-	NI	0,51	-	-
1594	-	NI	0,83	-	-
1596	-	NI	-	0,49	-
1598	-	NI	1,74	-	-
1602	1608	β-Atlantol	0,6	15,35	Álcool sesquiterpênico monocíclico
1607	1622	Isoespatuleno	14,98	-	Álcool sesquiterpênico bicíclico
1611	-	NI	-	1,00	-
1620	-	NI	-	0,72	-
1626	1639	allo-Aromadendreno epóxido	0,97	0,84	Sesquiterpeno tetracíclico oxigenado
1631	-	NI	-	0,59	-
1635	1668	trans-Calamenen-10-ol	1,01	0,54	Álcool sesquiterpênico bicíclico
1643	1676	Mustakona	1,54	-	Sesquiterpeno tricíclico oxigenado
1646	-	NI	1,14	-	-
1648	-	NI	0,80	-	-
1653	-	NI	0,71	-	-
1673	1695	Ciperotundona	0,92	-	Sesquiterpeno tricíclico oxigenado
1676	-	NI	0,45	-	-
1677	1668	14-hidroxi-9-epi-(E)-Cariofileno	-	1,12	Álcool sesquiterpênico bicíclico
1686	-	NI	0,45	-	-

TABELA 14 – IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. COLETADAS NO VERÃO (OE1) E INVERNO (OE2) (conclusão)

IA	IA teórico	Composto	[] %		Classificação
			OE1	OE2	
1690	1685	Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol ¹	0,85	-	Álcool sesquiterpênico bicíclico
1694	-	NI	0,6	-	-
1709	1740	Sulfeto de menta	0,32	-	Sesquiterpeno bicíclico
1734	-	NI	0,55	-	-
1753	-	NI	-	1,55	-
1807	-	NI	-	0,43	-
1829	1845	Hexahidrofarnesil acetona ¹	0,43	-	Outro
2098	1942	Fitol	0,49	-	Álcool diterpenico alifático
Total			100,00	94,25	

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) Biblioteca NIST 14; IA = índice aritmético; NI = não identificado;

Como pode ser visto, na amostra OE1, foram identificados 39 compostos (82,19% da amostra), não sendo observada a presença de monoterpenos. A predominância dos sesquiterpeno já foi observada para outras espécies do gênero (TAKAKU; HABER; SETZER, 2007). Entre os sesquiterpenos encontrados, a maior parte (55,28%) é oxigenado, dos quais a maioria pode ser classificado como álcool.

No que se refere aos componentes majoritários do OE1, pode-se destacar o espatulenol (16,4%), isoespatulenol (14,98%) e o óxido de cariofileno (6,44%), representados na FIGURA 18.

Dos compostos citados, dois já foram estudados quanto às suas atividades biológicas. O espatulenol mostrou-se ativo contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis* (ULUBELEN et al., 1994), e em ensaio alelopático foi capaz de inibir o crescimento do coleóptilo de trigo (CANDIDO et al., 2016). Esta substância também aparentou inibir a bomba de efluxo em células de linfoma multi-resistentes, gerando uma maior susceptibilidade da célula ao quimioterápico (MARTINS et al., 2010).

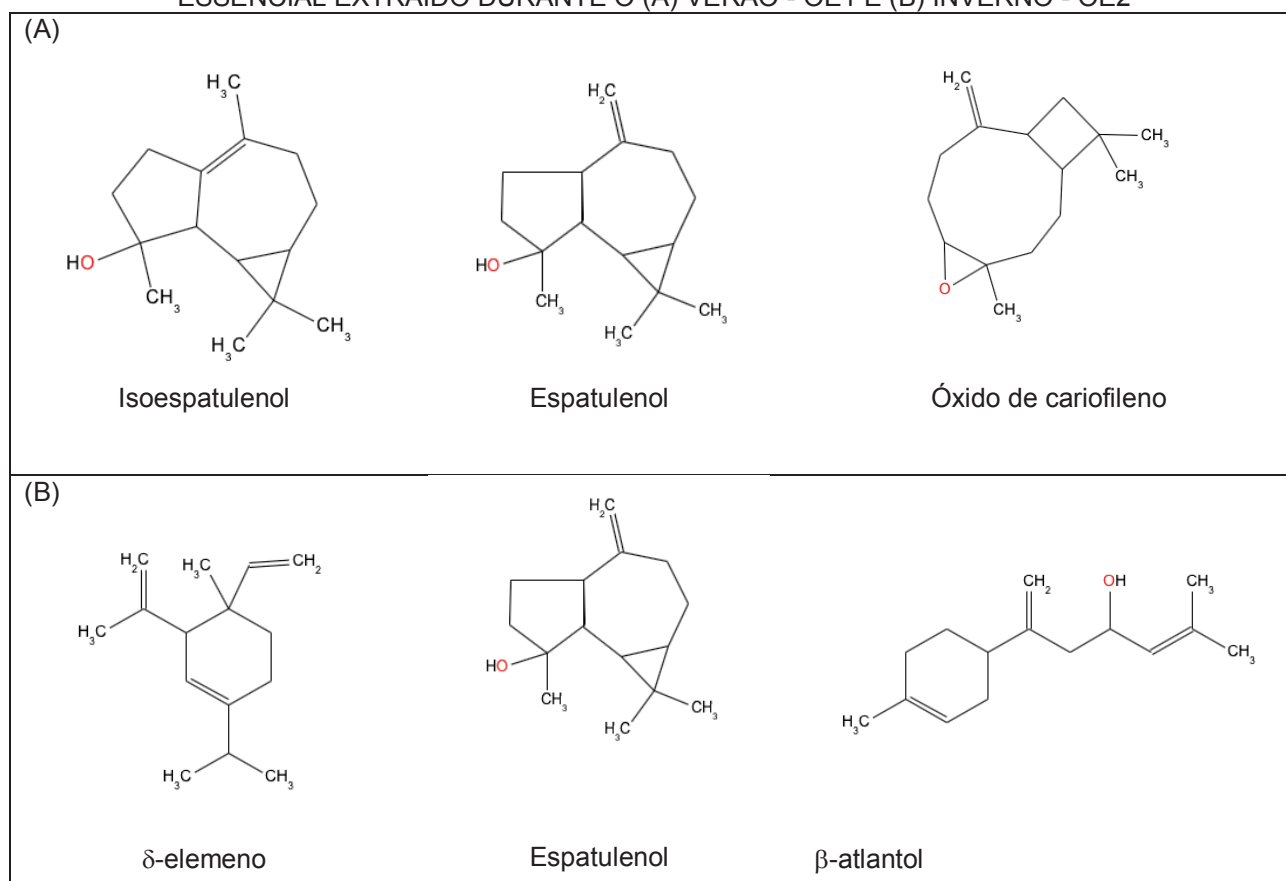
O óxido de cariofileno também tem demonstrado potencial no âmbito das atividades biológicas, uma vez que estudos vem comprovando sua ação redutora da contração cardíaca (SENSCH et al., 2000) e antinociceptiva (CHAVAN; WATKE; SHINDE, 2010) em modelos animais. Além disso, ensaios *in vitro* sugerem sua atividade indutora de apoptose em células de tumor de mama e próstata (PARK et al., 2011).

Já na amostra OE2, foram identificados 26 compostos, totalizando 86,53% da amostra. Em relação a classificação, também houve uma predominância dos sesquiterpenos (85,7%). Porém, diferentemente do OE1, os sesquiterpenos hidrocarbonetos foram encontrados em maior quantidade (55,91%), em comparação com os oxigenados (29,79%). Ainda, entre os oxigenados pode-se perceber a preponderância dos álcoois sesquiterpênicos (28,95% da amostra). Os monoterpenos representam apenas 0,83% do OE2.

O perfil encontrado no OE2 assemelha-se ao descrito para o óleo essencial das folhas de *Ocotea brenesii* Standl., constituído de 53,4% de sesquiterpenos hidrocarbonetos e 29,9% de sesquiterpenos oxigenados (CHAVERRI; CICCIO, 2005).

Dentre os 26 compostos identificados, as 3 substâncias encontradas em maior proporção na amostra OE2 foram o δ -elemeno (25,93%), β -atlantol (15,35%) e, novamente, o espatulenol (11,4%), representados na FIGURA 18. Pode-se perceber ainda a presença do β e γ -elemeno (9,49 e 2,86%, respectivamente), sendo a amostra composta em cerca de 40% por substâncias com o esqueleto do elemeno.

FIGURA 18 – ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DURANTE O (A) VERÃO - OE1 E (B) INVERNO - OE2



FONTE: Adaptado de PubChem (2018).

O δ -elemeno demonstrou ter atividade antitumoral pela indução da apoptose em células de carcinoma cervical (WANG et al., 2006) e adenocarcinoma coloretal (XIE et al., 2009). Seu isômero, β -elemeno, apresentou potencial de inibição *in vitro* da metástase de células de tumor mamário (ZHANG et al., 2013) e, associado à concentrações subtóxicas de etoposídeo, mostrou ter um efeito citotóxico sinérgico em linhagens de carcinoma pulmonar (ZHANG et al., 2011). Tendo em vista que o δ e β -elemeno são responsáveis por aproximadamente 35% da composição do OE2, seria interessante avaliar este óleo em relação à sua atividade antitumoral.

Um estudo realizado por Takaku, Haber e Setzer (2007) avaliou e comparou a composição química dos óleos essenciais de dez espécies de *Ocotea*, e encontrou nove substâncias comuns à maioria dos indivíduos avaliados: α -pineno, β -pineno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, germacreno-D, γ -cadineno, ω -cadineno e α -cadinol. Destes, apenas 2 estavam presentes na amostra OE1, e 4 na amostra OE2, revelando uma composição diferenciada.

Analizando ambas as amostras, percebe-se que na coleta realizada em março (OE1) a concentração dos 3 compostos majoritários foi menos expressiva quando comparado ao OE2. Ainda, como pode ser visto pelos cromatogramas (FIGURAS 16 e 17), o OE1 apresentou uma maior complexidade na composição química, evidenciada pela presença de uma maior quantidade de picos.

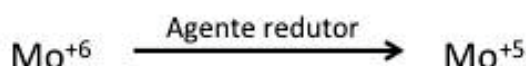
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são conhecidas por alterarem estruturas e funções celulares e, com isso, sugere-se que estejam relacionadas às doenças neurodegenerativas, câncer (NIKI, 2012, THANAN et al., 2015, BARRERA et al., 2016) e aterosclerose (NIKI; 2012). Assim, substâncias antioxidantes, ou soluções que as contenham, tornam-se de grande importância, visto que conseguem prevenir ou retardar a velocidade da oxidação através de um ou mais mecanismos (BENZIE; STRAIN, 1996). A utilização de mais de um ensaio para avaliar a atividade antioxidante permite observar as amostras frente a esses diferentes modos de ação.

Um dos métodos utilizados foi a redução do complexo fosfomolibdênio. O princípio deste ensaio baseia-se na reação apresentada na FIGURA 19. O reativo utilizado no experimento é composto, dentre outras coisas, de molibdato de amônio, o

qual ao se dissociar libera molibdênio VI. A presença de um composto antioxidante provoca a redução do molibdênio VI, gerando o molibdênio V. Este elemento, por sua vez, reage com o fosfato de sódio formando o complexo fosfomolibdênio, que tem um máximo de absorção em 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1998).

FIGURA 19 – REAÇÃO DE PRODUÇÃO DO MOLIBDÊNIO V DURANTE O ENSAIO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO



FONTE: adaptado de PRIETO; PINEDA; AGUILAR (1998).

Os resultados obtidos neste ensaio podem ser vistos na TABELA 15.

TABELA 15 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. FRENTE À RUTINA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO

FRENTE A ROTINA, BHT E ÁCIDO ASCÓRBICO							
Amostra		AAR% ¹ Rutina		AAR% ¹ BHT		AAR% ¹ Ácido ascórbico	
		Média ± DP	Teste Tukey ²	Média ± DP	Teste Tukey ²	Média ± DP	Teste Tukey ²
Folha	Rutina	100	c/d	-	-	-	-
	BHT	-	-	100	g	-	-
	Ácido ascórbico	-	-	-	-	100	e
	Extrato Bruto	81,92 ± 1,70	b/c	41,11 ± 0,85	c/d	25,81 ± 0,53	b
	Fração Hexano	110,86 ± 5,38	d/e	48,55 ± 2,35	d/e	25,14 ± 1,22	b
	Fração Clorofórmio	111,99 ± 4,23	d/e	52,00 ± 1,97	e/f	35,78 ± 1,35	c
	Fração Acetato de etila	83,46 ± 3,31	b/c	34,14 ± 1,35	b/c	22,48 ± 0,89	b
	Fração Remanescente	31,43 ± 1,08	a	13,49 ± 0,46	a	12,42 ± 0,42	a
Galho	Óleo essencial	284,62 ± 18,31	g	134,10 ± 8,63	h	89,17 ± 5,74	d
	Extrato Bruto	73,65 ± 4,76	b	29,11 ± 1,88	b	16,65 ± 1,08	a
	Fração Hexano	120,48 ± 4,05	e/f	60,11 ± 2,02	f	37,74 ± 1,27	c
	Fração Clorofórmio	120,34 ± 2,69	e/f	60,04 ± 1,34	f	37,69 ± 0,84	c
	Fração Acetato de etila	134,05 ± 6,72	f	54,97 ± 2,75	e/f	36,20 ± 1,81	c
	Fração Remanescente	37,19 ± 2,47	a	15,97 ± 1,06	a	14,69 ± 0,98	a
	Fração Etanol	88,20 ± 5,35	b/c	37,86 ± 2,30	c	34,84 ± 2,11	c

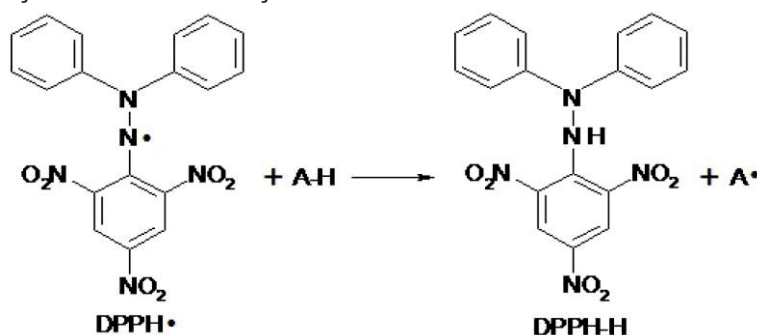
FONTE: o autor (2018).

NOTA: (1) AAR%: atividade antioxidante relativa, expressa em porcentagem; (2) grupos iguais, na mesma coluna, representam resultados sem diferença significativa; grupos diferentes, na mesma coluna, representam resultados com diferença significativa.

Pode-se observar que a amostra com os resultados mais promissores foi o óleo essencial, com atividade superior à rutina e ao BHT, como evidenciado pela análise estatística. Já dentre os extratos e frações, destacou-se a acetato de etila proveniente do galho, seguido das frações hexano e clorofórmio (galho e folha), com resultados estatisticamente similares.

A segunda técnica utilizada para avaliar a atividade antioxidante foi a redução do radical livre DPPH•. Tal molécula apresenta coloração violeta devido a presença de um elétron desemparelhado (SANTOS et al., 2007). Quando esse radical livre entra em contato com substâncias antioxidantes (AH) ocorre uma reação de oxirredução (FIGURA 20), dando origem ao DPPH-H, um composto incolor (MENSOR et al., 2001).

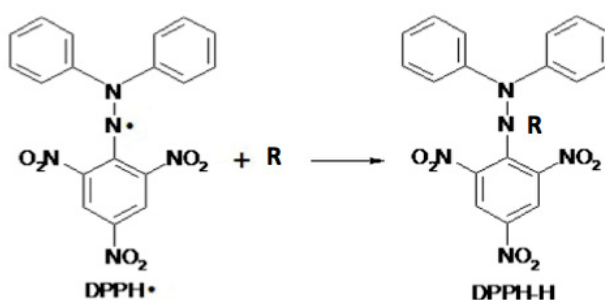
FIGURA 20 – REAÇÃO DE OXI-REDUÇÃO DO RADICAL DPPH• COM O ANTIOXIDANTE



FONTE: Adaptado de Borges et al. (2011).

Ainda, o DPPH• pode interagir com outros radicais (gerados inclusive pela perda de um hidrogênio ácido do antioxidante), formando compostos mais estáveis (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2004) como representado na FIGURA 21.

FIGURA 21 – REAÇÃO DO RADICAL DPPH• COM OUTRO RADICAL



FONTE: Adaptado de Foti, Daquino e Geraci (2004).

Neste ensaio, para analisar o óleo essencial das folhas foi necessário adaptar a metodologia, visto que sua Cl_{50} seria acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Sendo assim, testou-se apenas uma única concentração (200 $\mu\text{g/mL}$), e a atividade antioxidante em porcentagem resultou em $(10,22 \pm 0,40)\%$. Os controles positivos (ácido ascórbico, BHT e rutina) também foram testados na mesma concentração, a partir da qual foram

capazes de inibir uma média de 95% dos radicais. A análise estatística evidenciou a diferença significativa entre a amostra e os padrões.

Para as demais amostras foram feitas curvas com oito concentrações, escolhidas de modo a abranger a CI_{50} . Os dados das curvas e valores de CI_{50} obtidos podem ser vistos na TABELA 16.

TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO DPPH• DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez.

PROVENIENTES DE <i>Citrus decapinnata</i> (MOMO) WZL					
Amostra	Cl ₅₀ (µg/mL) ¹		Dados da curva		
	Média ± DP	Teste Tukey ²	Equação	R ²	
Rutina	7,00 ± 0,16	a	y = -0,179x ² + 7,2444x + 7,9963	0,9960	
BHT	16,38 ± 0,25	a	y = 0,0137x ² + 1,0371x + 29,378	0,9959	
Ácido ascórbico	5,58 ± 0,04	a	y = 0,0851x ² + 6,1162x + 13,102	0,9965	
Folha	Extrato Bruto	274,27 ± 9,36	g	y = 0,00009x ² + 0,1806x + 8,3175	0,9989
	Fração Hexano	340,40 ± 11,5	h	y = 0,00004x ² + 0,0837x + 16,423	0,9908
	Fração Clorofórmio	93,33 ± 2,54	c/d	y = -0,0011x ² + 0,5708x + 6,4943	0,9970
	Fração Acetato de etila	98,54 ± 2,29	d	y = -0,0011x ² + 0,5793x + 4,285	0,9982
	Fração Remanescente	231,29 ± 9,64	f	y = -0,00005x ² + 0,1254x + 22,911	0,9820
Galho	Extrato Bruto	81,46 ± 1,75	c	y = -0,0011x ² + 0,5996x + 8,1328	0,9982
	Fração Hexano	506,18 ± 8,95	i	y = -0,00002x ² + 0,0869x + 11,194	0,9986
	Fração Clorofórmio	130,44 ± 4,39	e	y = -0,0003x ² + 0,3261x + 13,039	0,9976
	Fração Acetato de etila	50,64 ± 0,14	b	y = -0,0018x ² + 0,8149x + 13,438	0,9976
	Fração Remanescente	97,79 ± 5,11	c/d	y = -0,0003x ² + 0,3787x + 10,584	0,9982
	Fração Etanol	50,63 ± 0,74	b	y = -0,0029x ² + 1,0632x + 3,6114	0,9970

FONTE: o autor (2018).

NOTA: (1) CI_{50} : concentração inibitória 50%; (2) grupos iguais, na mesma coluna, representam resultados sem diferença significativa; grupos diferentes, na mesma coluna, representam resultados com diferença significativa.

A partir dos resultados apresentados, pode-se perceber que as frações acetato de etila e etanólica do galho foram as mais expressivas em relação a atividade antioxidante. Porém, os valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de tais amostras ainda são cerca de 10 vezes maiores quando comparado ao ácido ascórbico, 7 vezes quando comparado com o BHT, e 3 vezes quando comparado a rutina.

Por se tratar de um radical estável, o DPPH• reage de maneira estequiométrica apenas com moléculas que sejam boas doadoras de hidrogênio (SCHWARZ et al; 2001). Dentre essas moléculas podemos citar as que contêm grupos hidroxila ativos, ou seja, capazes de doar o seu hidrogênio, como as vitaminas E e C, polifenóis, flavonóis (LU et al., 2010) e moléculas com hidrogênios alílicos (CAI et al., 2002, LU et al., 2010), como os carotenoides (WISEMAN; HALLIWELL, 1996). Ainda, no caso de compostos hidroxilados, quanto maior o número de -OH na estrutura do antioxidante, maior a quantidade de moléculas de DPPH eliminadas por ele (BRAND-

WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995, MENSOR et al., 2001, MAGALHÃES et al., 2008).

Logo, espera-se que as frações mais polares, as quais possuem um maior número de compostos com hidroxilas disponíveis, apresentem os melhores resultados (MENSOR et al., 2001). Além disso, o meio reacional é considerado polar, visto que as amostras e o reativo são preparados em metanol. Tal fato facilita a solubilização de moléculas com essa mesma característica físico-química, em detrimento de moléculas apolares. Assim, os menores valores de IC₅₀ para a fração etanol e acetato de etila (galho) condizem com o previsto acima, e indicam a possível presença de polifenóis em tais amostras. Somado a isso, tem-se os resultados da cromatografia em camada delgada, com evidências de presença flavonoides.

Por outro lado, a fração acetato de etila das folhas apresentou uma IC₅₀ próxima de 100 µg/mL, quase duas vezes o valor descrito para o galho. Apesar de esta fração também ter sido positiva para a presença de flavonoides, é possível que estes possuam uma menor quantidade de hidroxilas disponível, visto que um dos fatores que influencia na reação entre o DPPH• e o antioxidante é a acessibilidade estérica ao sítio reacional (MAGALHÃES et al., 2008). Outra justificativa seria a presença de flavonoides em menor quantidade, já que os ensaios por CCD realizados tem caráter qualitativo.

O potencial antioxidante de algumas espécies de *Ocotea* Aubl. foi avaliado pelo mesmo método de redução do DPPH• utilizado neste trabalho (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; JUNIOR, 2012). Os resultados obtidos no estudo podem ser vistos na TABELA 17. A espécie *Ocotea splendens* também foi estudada, mas, por não demonstrar atividade antioxidante em um ensaio preliminar qualitativo, não foi avaliada quantitativamente (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; JUNIOR, 2012).

TABELA 17 – RESULTADOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE AVALIADA PELA REDUÇÃO DO DPPH• DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *Ocotea* Aubl.

Espécie	IC ₅₀ (µg/mL)	
	Folhas	Galhos
<i>Ocotea diospyrifolia</i> ¹	274,27 ± 9,36	81,46 ± 1,75
<i>Ocotea ceanothifolia</i> ²	18,12 ± 0,18	15,64 ± 0,72
<i>Ocotea leucoxylon</i> ²	52,51 ± 1,42	50,88 ± 0,64
<i>Ocotea minor</i> ²	8,21 ± 0,66	9,08 ± 0,51
<i>Ocotea nigrescens</i> ²	168,73 ± 21,79	Não avaliado

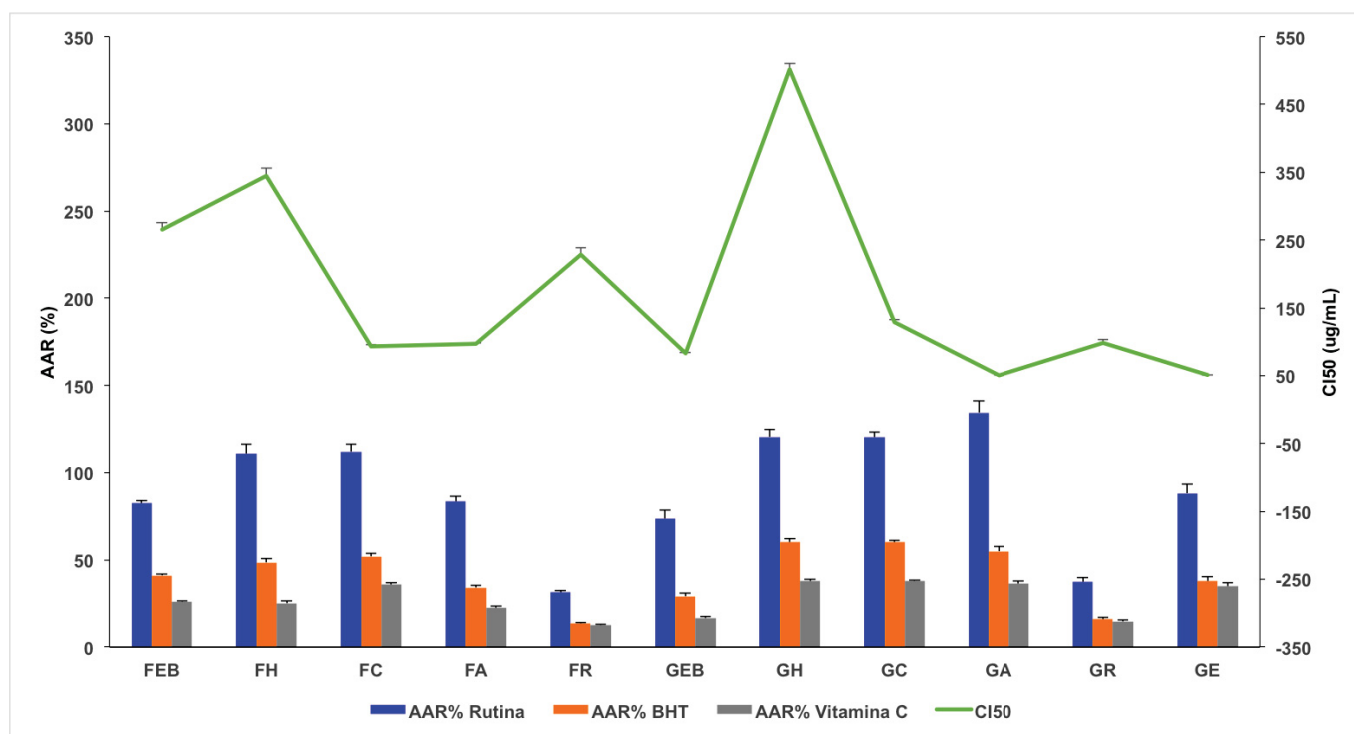
FONTE: (1) o autor (2018); (2) Yamaguchi; Alcântara; Junior (2012).

Como pode ser visto, os resultados obtidos com a *Ocotea diospyrifolia* foram menos expressivos quando comparado às demais espécies.

É importante ressaltar que todos os extratos foram feitos utilizando como solvente o etanol, porém o método de extração diferiu. Yamaguchi, Alcântara e Junior (2012) empregou a técnica de maceração a frio, enquanto o extrato bruto da *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. foi preparado no aparelho de Soxhlet. Como já mencionado anteriormente, a diferença de técnicas pode influenciar na composição do extrato obtido. Ainda assim, pode-se observar uma variação na capacidade de eliminar radicais livres entre as espécies do gênero *Ocotea*.

No GRÁFICO 1, é possível comparar os resultados obtidos na capacidade redutora do DPPH•, e na formação do complexo fosfomolibdênio.

GRÁFICO 1 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PELAS METODOLOGIAS DE REDUÇÃO DO DPPH• E FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: AAR% = Atividade antioxidante relativa; CI50 = Concentração inibitória 50%; FEB = Extrato bruto da folha; FH = Fração hexano da folha; FC = Fração clorofórmio da folha; FA = Fração acetato de etila da folha; FR = Fração remanescente da folha; GEB = Extrato bruto do galho; GH = Fração hexano do galho; GC = Fração clorofórmio do galho; GA = Fração acetato de etila do galho; GR = Fração remanescente do galho; GE = Fração etanólica do galho.

Como o GRÁFICO 1 evidencia, o comportamento em relação a capacidade antioxidante não seguiu o mesmo padrão nas duas técnicas. Um exemplo disso é o

resultado obtido com a fração hexano do galho, a qual apresentou a maior CI_{50} dentre as amostras testadas, porém uma das maiores atividades antioxidantes relativas (AAR%). Um perfil parecido pode ser observado na fração hexano das folhas. Os resultados obtidos com o óleo essencial, apesar de não representados no gráfico, também diferiram nas duas técnicas.

Um dos fatores que pode explicar esse comportamento é a diferença nas condições em que o experimento foi realizado. Apesar de ambos estarem inseridos em um meio reacional polar, no ensaio de formação do complexo fosfomolibdênio a solução é submetida a uma temperatura de 90°C, o que auxilia a solubilização dos compostos apolares, como os carotenoides.

Tal diferença de resposta diante de técnicas distintas evidencia a importância do uso de mais de uma metodologia para a avaliação da atividade antioxidante. Isso porque as amostras testadas possuem uma diversidade de compostos, com características físico-químicas e mecanismos de ação variados. Ainda, sabe-se que a atividade resultante deriva não apenas do desempenho de cada molécula, mas do sinergismo e/ou antagonismo entre as substâncias (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Os extratos brutos, frações e o óleo essencial também foram avaliados quanto a capacidade de proteger um substrato lipídico da oxidação, no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Essa técnica tem como princípio a degradação oxidativa do ácido linoleico, a partir da qual são liberados produtos capazes de oxidar o β -caroteno, causando sua descoloração (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Ao final do tempo de reação (120 minutos), a maior parte das amostras não foi capaz de evitar a oxidação do β -caroteno, com exceção da fração etanólica dos galhos (proteção = $8,69 \pm 2,58\%$). Entre os padrões, o BHT e a rutina apresentaram valores de proteção de $(55,79 \pm 1,10)\%$ e $(7,76 \pm 1,33)\%$, respectivamente. O ácido ascórbico não se mostrou capaz de proteger o β -caroteno, fato já evidenciado por Duarte-Almeida (2006).

O cálculo de F1 e F2 (TABELA 18) permite avaliar se as amostras causaram alguma alteração na velocidade de reação, apesar de não terem impedido a oxidação do substrato. Tal observação é feita pela comparação entre a curva de cinética obtida para o controle negativo e a curva proveniente de cada amostra, em duas etapas distintas da oxidação.

O valor de F1 diz respeito a eficiência em bloquear a formação dos radicais peróxidos, mensurado na primeira parte da curva; já F2 traz informações sobre a possibilidade das amostras agirem em outras reações do processo oxidativo, onde os radicais formados passam a degradar o substrato lipídico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). É importante notar que valores de F1 e F2 próximos de 1 indicam ausência de atividade; abaixo de 1 indicam aumento na velocidade de reação comparado ao controle; e acima de 1 indicam diminuição da velocidade.

TABELA 18 – VALORES DE F1 E F2 PARA O CONTROLE, PADRÕES E AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

Amostra		F1		F2	
		Média ± DP	Teste Tukey ¹	Média ± DP	Teste Tukey ¹
Folha	Controle	1,00	b	1,00	a/b
	Ácido ascórbico	0,67 ± 0,09	a	0,53 ± 0,23	a
	BHT	1,06 ± 0,01	b/c/d	2,31 ± 0,08	e
	Rutina	1,06 ± 0,03	b/c/d	1,50 ± 0,20	b/c/d
	Extrato bruto	1,12 ± 0,03	c/d	1,55 ± 0,07	b/c/d
	Fração hexano	1,17 ± 0,03	d	1,82 ± 0,25	d/e
	Fração clorofórmio	1,13 ± 0,02	c/d	1,68 ± 0,17	c/d/e
	Fração acetato de etila	1,11 ± 0,03	c/d	1,60 ± 0,16	b/c/d
	Fração remanescente	1,11 ± 0,03	b/c/d	1,57 ± 0,16	b/c/d
	Óleo essencial	1,02 ± 0,03	b/c	1,08 ± 0,13	a/b/c
Galho	Extrato bruto	1,14 ± 0,02	d	1,82 ± 0,03	d/e
	Fração hexano	1,14 ± 0,04	d	1,72 ± 0,17	c/d/e
	Fração clorofórmio	1,09 ± 0,06	b/c/d	1,74 ± 0,21	c/d/e
	Fração acetato de etila	1,11 ± 0,05	b/c/d	1,69 ± 0,13	c/d/e
	Fração remanescente	1,10 ± 0,02	b/c/d	1,40 ± 0,16	b/c/d
	Fração etanólica	1,12 ± 0,02	c/d	2,05 ± 0,25	d/e

FONTE: o autor (2018).

NOTA: (1) grupos iguais, na mesma coluna, representam resultados sem diferença significativa; grupos diferentes, na mesma coluna, representam resultados com diferença significativa.

Pela análise dos resultados descritos na TABELA 18, nota-se que para o ácido ascórbico, o valor de F1 foi abaixo de 1 e diferiu estatisticamente do controle, indicando que a substância em questão acelerou a oxidação do β -caroteno. Tal fato pode ser justificado pela formação de um radical instável (ascorbila), após o ácido ascórbico doar seus hidrogênios redutores (BORS; BUETTNER, 1997).

Ainda, é possível inferir que a atividade protetora obtida para o BHT e rutina se deu pela ação na segunda etapa cinética (F2), visto que os valores de F1 não diferiram significativamente do controle. Já a fração etanólica dos galhos interferiu em ambas as etapas cinéticas, porém com maior eficiência na segunda (F2>F1).

Para as demais amostras provenientes de *O. diospyrifolia*, observa-se que algumas delas influenciaram na velocidade de reação, apesar de, no geral, não terem protegido o β -caroteno. As frações hexano (folha e galho), por exemplo, diminuíram a velocidade de reação tanto na formação dos radicais, quanto na segunda etapa. Em ambas as amostras foi constatada a presença do β -caroteno ($4,71 \pm 0,36 \mu\text{g/mg}$ para a folha, $0,74 \pm 0,02 \mu\text{g/mg}$ para os galhos), o que pode ter contribuído com a diminuição da velocidade, visto que a quantidade de substrato a ser oxidado se tornou maior.

Algumas das amostras influenciaram apenas em uma das etapas, como foi o caso do extrato bruto (folha e galho) e frações clorofórmio e acetato de etila da folha ($F1 > 1$); e fração clorofórmio da folha, extrato bruto e frações clorofórmio e acetato de etila dos galhos ($F2 > 1$).

Apesar de, na maioria dos casos, a influência na velocidade não ter sido tão expressiva a ponto de proteger o β -caroteno, os resultados apontam para a presença de compostos com capacidade de interagir com os produtos de degradação do ácido linoleico.

A partir das diferentes metodologias testadas, observou-se que as amostras com maior destaque em relação a atividade antioxidante foram as frações acetato de etila e etanólica dos galhos. Essa ação se dá, provavelmente, pela presença de flavonoides, o que torna essas amostras interessantes para estudos relacionados às suas atividades antioxidantes *in vivo*.

4.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina*

Na avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina*, apenas o óleo essencial das folhas e a fração hexano do galho apresentaram CL_{50} abaixo de $1000 \mu\text{g/mL}$.

De acordo com Amarante et al. (2011), a toxicidade pode ser estratificada em três níveis: baixa (CL_{50} superior a $500 \mu\text{g/mL}$), moderada (CL_{50} entre 100 e $500 \mu\text{g/mL}$) e muito tóxico (CL_{50} inferior a $100 \mu\text{g/mL}$). Baseado nisso, e tendo em vista os resultados expostos na TABELA 19, pode-se dizer que o óleo das folhas e a fração hexano do galho apresentaram baixa toxicidade.

Para as demais amostras testadas, a concentração que matou 50% dos indivíduos ficou acima de 1000 µg/mL, e portanto não foram consideradas tóxicas (MEYER et al., 1982).

TABELA 19 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE A *Artemia salina* DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE

Amostra	CL ₅₀ (µg/mL) ¹	Intervalo de confiança	Teste de qui-quadrado		
			Qui quadrado	Grau de liberdade	Nível de significância
Sulfato de quinidina	101,03	59,52 – 154,92	14,78	5	0,01
Óleo essencial – Folhas	602,81	524,09 – 744,06	3,38	6	0,76
Fração Hexano - Galho	529,97	457,84 – 614,75	3,55	5	0,62

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) CL₅₀: Concentração letal 50%.

A importância deste ensaio no estudo de produtos naturais se dá pela relação de resultados de toxicidade com um potencial para atividades biológicas e, consequentemente, com a presença de moléculas bioativas (AMARANTE et al., 2011). Logo, partindo dos valores de CL₅₀ obtidos, é possível assumir que as duas amostras tóxicas apresentam compostos de interesse farmacológico, com aplicação na área de medicamento anticâncer, por exemplo.

Nesse sentido, podemos observar que a fração hexano do galho teve a presença de esteroides e triterpenos confirmada. Os esteroides tem sido estudados como alternativas para o combate a células malignas multi-resistentes (ZEINO et al., 2015). Da mesma forma, os triterpenos já demonstraram ter atividade citotóxica em diversas linhagens celulares cancerígenas, incluindo leucemia, melanoma, carcinoma pulmonar e ovariano (CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL, 2015). Além disso, essa classe de compostos também apresenta um potencial anti-inflamatório (LIAW et al., 2013) e antiviral (BALTINA et al., 2003).

Em relação ao óleo essencial, sabe-se que seus compostos majoritários possuem atividade citotóxica conhecida, como descrito no item 4.7. A toxicidade frente a *Artemia salina* foi observada para o óleo de outras espécies do gênero, como na *Ocotea floribunda* (IC₅₀: 3,7 µg/mL) (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007). Essa mesma espécie também apresentou-se tóxica para células da linhagem Hep G2 e a bactéria *S. aureus* (WERKA; BOEHME; SETZER, 2007).

Por outro lado, a ausência de toxicidade em *Artemia salina* pode ser um indicativo de segurança no uso de amostras com boa atividade antioxidante, como as frações acetato de etila e etanol dos galhos.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Na avaliação da atividade hemolítica, apenas o óleo essencial das folhas e as frações hexano e clorofórmio do galho foram capazes de lisar as hemáceas (TABELA 20).

TABELA 20 – RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO PADRÃO E DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meins.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% hemólise			
		Triton 1%		Água potável	
		Média \pm DP	Teste Tukey ¹	Média \pm DP	Teste Tukey ¹
Saponina	100	20,55 \pm 2,26	b/c	19,04 \pm 2,09	d/e
	250	67,45 \pm 4,94	g	62,51 \pm 4,58	i
	500	87,05 \pm 3,23	h	80,68 \pm 2,99	j
	750	90,96 \pm 1,4	h	84,30 \pm 1,30	j
	1000	89,4 \pm 6,58	h	82,86 \pm 6,10	j
Óleo essencial – folhas	100	14,00 \pm 1,33	a/b	13,73 \pm 1,30	b/c/d
	250	34,58 \pm 8,21	d/e	33,90 \pm 8,05	f/g
	500	44,17 \pm 1,91	e/f	43,29 \pm 1,88	g/h
	750	45,42 \pm 1,71	e/f	44,53 \pm 1,68	g/h
	1000	50,70 \pm 8,68	f	49,70 \pm 8,51	a8
Fração hexano - galho	100	1,61 \pm 0,63	a	1,42 \pm 0,56	a
	250	3,03 \pm 2,25	a	2,67 \pm 1,98	a/b/c
	500	18,04 \pm 5,40	b/c	15,92 \pm 4,76	d/e
	750	30,35 \pm 7,83	c/d	26,78 \pm 6,91	e/f
	1000	42,88 \pm 9,37	e/f	37,83 \pm 8,27	f/g/h
Fração clorofórmio - galho	100	2,23 \pm 0,38	a	1,95 \pm 0,34	a/b
	250	2,08 \pm 0,44	a	1,82 \pm 0,38	a/b
	500	3,32 \pm 1,06	a	2,90 \pm 0,92	a/b/c
	750	10,66 \pm 3,92	a/b	9,31 \pm 3,43	a/b/c/d
	1000	16,47 \pm 3,55	b	14,39 \pm 3,10	c/d

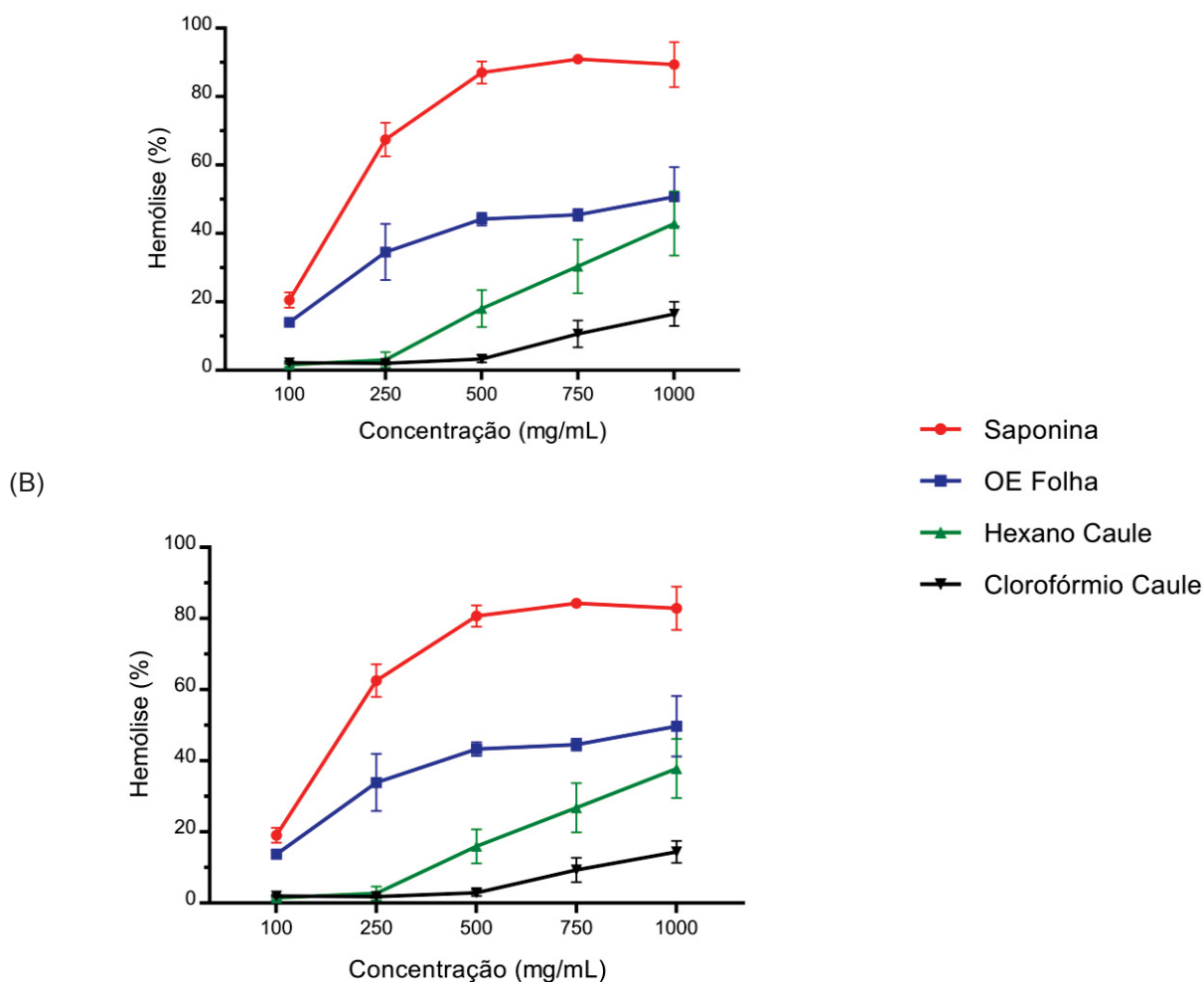
FONTE: O autor (2018).

Nota: (1) grupos iguais, na mesma coluna, representam resultados sem diferença significativa; grupos diferentes, na mesma coluna, representam resultados com diferença significativa

Como pode ser observado na TABELA 20, e melhor evidenciado no GRÁFICO 2, o óleo essencial foi o que demonstrou a maior atividade hemolítica. Porém a amostra parece ter atingido um *plateau* próximo de 50%, visto que o aumento na concentração não elevou significativamente a porcentagem de células hemolisadas. Uma possível explicação seria a limitação na solubilidade da amostra, que é composta majoritariamente por sesquiterpenos hidrocarbonetos.

A hemólise causada pela fração hexano dos galhos, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, foi estatisticamente similar ao resultado obtido com o óleo essencial, na mesma concentração.

GRÁFICO 2 – RESULTADOS DE HEMÓLISE EM RELAÇÃO AO TRITON 1% (A) E À ÁGUA (B) DA SAPONINA E AMOSTRAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE (A)



FONTE: O autor (2018).

Assim como a toxicidade frente a *Artemia salina*, o ensaio de atividade hemolítica é um indicador de citotoxicidade, e o resultado é dependente das propriedades físicas e estruturais das moléculas presentes na amostra (SHARMA; SHARMA, 2001). Portanto, o óleo essencial e a fração hexano do galho, assim como compostos isolados dos mesmos, seriam as primeiras escolhas para futuros ensaios de toxicidade em cultura celular.

4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOTÓXICA

No ensaio de atividade fitotóxica foi avaliada a influência dos extratos e frações na germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TBR (TABELA 21).

De acordo com a análise estatística, os *p* valores obtidos no teste de ANOVA para a % de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG) não foram significativos. Sendo assim, pode-se dizer que nenhuma das amostras testadas influenciou na germinação.

TABELA 21 - RESULTADOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

(continua)

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Germinação	IVG	Hipocótilo		Radícula	
		Média \pm DP (%)	Média \pm DP	Média \pm DP (mm)	Scot-Knott ¹	Média \pm DP (mm)	Scot-Knott ¹
Controle água	-	-	4,80 \pm 0,40	27,80 \pm 11,90	b	35,90 \pm 13,89	e
Controle Tween 80 [®]	-	100 \pm 0	4,25 \pm 0,25	27,90 \pm 4,63	b	35,60 \pm 8,14	e
Extrato bruto	100	100 \pm 0	4,80 \pm 0,40	27,40 \pm 3,50	b	36,8 \pm 10,00	e
	250	100 \pm 0	4,58 \pm 0,40	23,50 \pm 6,40	a	32,00 \pm 7,97	d
	500	95 \pm 10	4,19 \pm 0,24	25,30 \pm 3,20	b	31,00 \pm 8,43	d
	750	95 \pm 10	4,50 \pm 0,71	39,50 \pm 3,00	c	35,70 \pm 4,52	e
	1000	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	26,20 \pm 2,70	b	29,50 \pm 7,00	d
Fração hexano	100	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	28,30 \pm 2,30	b	35,50 \pm 6,07	d
	250	100 \pm 0	4,58 \pm 0,50	26,40 \pm 3,07	b	35,80 \pm 6,59	e
	500	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	22,90 \pm 7,47	a	31,60 \pm 10,19	d
	750	100 \pm 0	4,71 \pm 0,34	26,20 \pm 6,87	b	30,40 \pm 8,43	d
	1000	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	27,90 \pm 2,65	b	29,10 \pm 4,14	d
Fração clorofórmio	100	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	26,10 \pm 8,12	b	25,90 \pm 10,15	c
	250	100 \pm 0	4,56 \pm 0,31	24,20 \pm 5,87	a	24,50 \pm 6,88	c
	500	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	26,00 \pm 3,24	b	16,60 \pm 2,85	b
	750	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	22,40 \pm 7,67	a	13,40 \pm 5,18	a
	1000	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	21,70 \pm 5,43	a	10,00 \pm 3,05	a
Fração acetato de etila	100	100 \pm 0	4,75 \pm 0,29	24,00 \pm 6,73	a	25,20 \pm 8,13	c
	250	100 \pm 0	4,37 \pm 0,48	24,60 \pm 5,43	a	21,20 \pm 4,17	c
	500	100 \pm 0	4,75 \pm 0,29	25,10 \pm 3,13	b	13,00 \pm 5,95	a
	750	100 \pm 0	4,75 \pm 0,29	21,90 \pm 5,52	a	9,90 \pm 4,74	a
	1000	100 \pm 0	4,75 \pm 0,5	21,90 \pm 3,63	a	8,60 \pm 3,35	a
Fração remanescente	100	100 \pm 0	4,71 \pm 0,34	30,05 \pm 7,32	b	44,10 \pm 6,00	f
	250	100 \pm 0	4,75 \pm 0,29	26,90 \pm 5,38	b	33,40 \pm 8,77	d
	500	95 \pm 10	4,46 \pm 0,42	28,55 \pm 3,33	b	30,60 \pm 3,65	d
	750	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	29,40 \pm 7,87	b	30,10 \pm 8,28	d
	1000	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	27,55 \pm 3,25	b	21,80 \pm 4,72	c

TABELA 21 - RESULTADOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

(conclusão)							
Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Germinação	IVG	Hipocótilo		Radícula	
		Média \pm DP (%)	Média \pm DP	Média \pm DP (mm)	Scot-Knott ¹	Média \pm DP (mm)	Scot-Knott ¹
Extrato bruto	100	95 \pm 10	4,75 \pm 0,50	30,20 \pm 7,65	b	37,50 \pm 11,11	e
	250	95 \pm 10	4,62 \pm 0,48	27,30 \pm 9,86	b	30,60 \pm 11,86	d
	500	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	20,40 \pm 7,49	a	27,70 \pm 10,76	d
	750	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	23,00 \pm 12,22	a	16,50 \pm 8,89	b
	1000	100 \pm 0	4,46 \pm 0,65	23,40 \pm 5,86	a	16,60 \pm 5,14	b
Fração hexano	100	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	19,60 \pm 5,55	a	33,60 \pm 11,33	d
	250	95 \pm 10	4,75 \pm 0,50	23,60 \pm 7,20	a	39,00 \pm 11,11	e
	500	95 \pm 10	4,19 \pm 0,55	19,20 \pm 10,76	a	30,30 \pm 16,06	d
	750	100 \pm 0	4,55 \pm 0,33	14,90 \pm 10,64	a	22,50 \pm 14,98	c
	1000	100 \pm 0	4,52 \pm 0,33	16,50 \pm 10,32	a	23,90 \pm 8,48	b
Fração clorofórmio	100	100 \pm 0	4,83 \pm 0,33	17,20 \pm 11,11	a	19,70 \pm 12,69	c
	250	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	28,60 \pm 7,59	b	29,30 \pm 6,95	d
	500	95 \pm 10	4,75 \pm 0,50	24,10 \pm 9,33	a	21,90 \pm 8,73	c
	750	95 \pm 10	4,46 \pm 0,79	21,10 \pm 11,06	a	17,30 \pm 9,49	b
	1000	100 \pm 0	4,71 \pm 0,58	21,70 \pm 9,92	a	17,30 \pm 8,48	b
Fração acetato de etila	100	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	29,10 \pm 5,79	b	27,00 \pm 6,56	d
	250	100 \pm 0	4,83 \pm 0,33	25,80 \pm 9,54	b	25,10 \pm 10,08	c
	500	100 \pm 0	4,68 \pm 0,37	16,00 \pm 12,26	a	12,90 \pm 9,52	a
	750	95 \pm 10	4,62 \pm 0,75	19,50 \pm 9,12	a	15,50 \pm 8,60	b
	1000	100 \pm 0	4,69 \pm 0,37	19,80 \pm 7,41	a	20,60 \pm 8,71	c
Fração remanescente	100	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	26,15 \pm 9,21	b	30,70 \pm 11,49	d
	250	95 \pm 10	4,75 \pm 0,50	26,95 \pm 7,51	b	41,20 \pm 5,90	f
	500	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	26,85 \pm 10,74	b	25,90 \pm 11,06	c
	750	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	30,15 \pm 4,51	b	31,60 \pm 6,05	d
	1000	95 \pm 10	4,75 \pm 0,50	26,60 \pm 6,94	b	23,20 \pm 7,11	c
Fração etanólica	100	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	28,1 \pm 3,67	b	31,60 \pm 4,44	d
	250	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	23,8 \pm 3,33	a	31,60 \pm 3,13	d
	500	100 \pm 0	4,87 \pm 0,25	39,4 \pm 2,52	c	24,60 \pm 3,91	c
	750	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	26,3 \pm 4,99	b	23,90 \pm 8,07	c
	1000	100 \pm 0	5,00 \pm 0,00	26,1 \pm 4,19	b	22,50 \pm 5,21	c

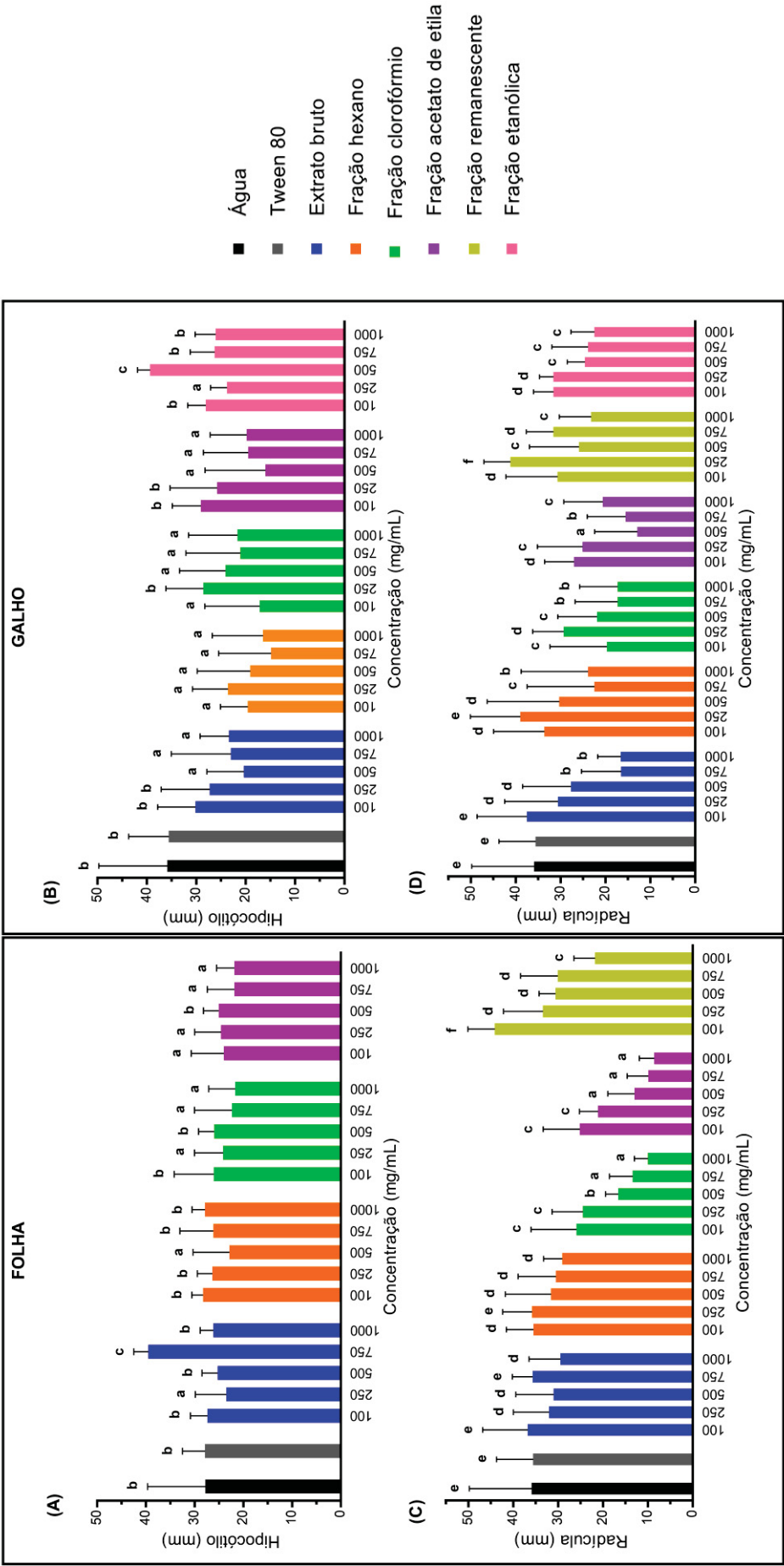
FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) grupos iguais, na mesma coluna, representam resultados sem diferença significativa; grupos diferentes, na mesma coluna, representam resultados com diferença significativa; (2) os grupamentos estatísticos foram colocados apenas para os testes com diferença entre as médias.

A influência causada pelos extratos e frações no crescimento do hipocótilo e da radícula pode ser vista no GRÁFICO 3. A fração remanescente não foi incluída no gráfico referente ao crescimento do hipocótilo, pois não apresentou atividade.

A partir dos resultados é possível observar que na maioria dos casos, quando houve influência, esta foi de inibição do crescimento. Essa influência no desenvolvimento das sementes de *Lactuca sativa* pode indicar a presença de metabólitos secundários bioativos (REGIOSA et al., 2013).

GRÁFICO 3 – INFLUÊNCIA DE AMOSTRAS PROVENIENTES DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NO CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TBR



FONTE: o autor (2018).

NOTA: Influência dos extratos e frações das folhas (A) e dos galhos (B) no crescimento do hipocótilo; influência dos extratos e frações das folhas (C) e dos galhos (D) no crescimento da radícula.

Dentre os resultados obtidos para o hipocótilo, merece destaque a fração hexano dos galhos, a qual inibiu o crescimento em todas as concentrações. Essa mesma fração também diminuiu o crescimento da radícula, exceto na concentração de 250 µg/mL. Tais resultados corroboram com os descritos anteriormente para esta fração (toxicidade frente a *Artemia salina* e hemólise), e evidenciam seu potencial para futuros ensaios de citotoxicidade.

As frações clorofórmio e acetato de etila (folhas e galhos) inibiram o hipocótilo na maior parte das concentrações, e a radícula em todas as concentrações testadas. O efeito de estímulo do crescimento foi pouco observado. Duas amostras (extrato bruto folha 750 µg/mL; etanol galho 500 µg/mL) estimularam o crescimento do hipocótilo. Para a radícula, pode ser visto que a fração remanescente (folha) estimulou o crescimento em 100 µg/mL, e a partir de 250 µg/mL passou a inibir o crescimento, de maneira dose-dependente. Esse perfil pode ser descrito como efeito hormético, onde doses subinibitórias de uma amostra fitotóxica apresentam efeito estimulatório em organismos (VIATOR et al., 2006). A hormese é vista como uma resposta adaptativa do organismo a um stress moderado e geralmente contínuo (MATTSON, 2008).

A capacidade de influenciar o desenvolvimento de outra espécie em laboratório indica que a planta produz compostos bioativos e que, sob condições naturais, esses compostos podem ter algum efeito no crescimento de espécies vizinhas (REGIOSA et al., 2013). Esse efeito é conhecido como atividade alelopática (MOLISCH, 1973).

Dentre as substâncias responsáveis pela atividade alelopática, tem-se os compostos fenólicos (MALHEIROS; PERES, 2001; COUTINHO et al., 2006b), esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (MALHEIROS; PERES, 2001). Tais compostos, ao inibir ou estimular o crescimento da plântula, mostram-se capazes de influenciar no desenvolvimento de sistemas biológicos (PINTO et al., 2002).

Os compostos fenólicos estão entre os principais agentes alelopáticos encontrados em plantas, e podem exercer sua influência no desenvolvimento de espécies de diferentes maneiras: aumento da permeabilidade da membrana, inibição da divisão celular, diminuição da capacidade respiratória, interferência no funcionamento de enzimas, diminuição ou inativação de hormônios e inibição da síntese de proteínas (LI et al., 2010). Assim, pode-se sugerir que a atividade inibitória

observada para as amostras positivas para flavonoides no *análise* por CCD (extratos brutos, frações clorofórmio e acetato das folhas e galhos, e frações remanescente e etanólica do galho) tenha sido, entre outras coisas, consequência da presença de tais substâncias.

A partir da comparação dos resultados, é possível ver que a radícula teve uma sensibilidade maior aos extratos e frações. Isso justifica-se pelo fato de esta ser a primeira parte da plântula a emergir da semente, além de ficar diretamente em contato com as amostras (TANVEER et al., 2012). No caso do óleo essencial, a amostra foi aplicada à tampa da gerbox, ficando mais próxima do hipocótilo. Logo, os ensaios de crescimento realizados com o óleo mostraram uma influência apenas no crescimento do hipocótilo, que ocorreu na maior concentração testada (1% m/v) (TABELA 22). Além disso, o papel filtro onde as sementes são dispostas é embebido em água, o que dificulta o contato do óleo no ambiente da gerbox com a radícula.

TABELA 22 - RESULTADOS DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids TRATADAS COM CONTROLES E ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez.

Amostra	Concentração (% m/v)	% germinação	IVG	Hipocótilo		Radícula
		Média ± DP (%)	Média ± DP	Média ± DP (mm)	Scot- Knott ¹	Média ± DP (mm)
Controle água	-	-	4,81 ± 0,37	29,87 ± 7,43	b	43,32 ± 12,52
Controle Tween 80®	-	100 ± 0	4,83 ± 0,33	29,90 ± 9,84	b	46,60 ± 17,3
	0,001	100 ± 0	4,71 ± 0,34	32,15 ± 9,73	b	45,80 ± 15,02
Óleo essencial - folhas	0,01	95 ± 10	4,50 ± 0,71	30,35 ± 10,32	b	47,60 ± 17,91
	0,1	100 ± 0	4,62 ± 0,48	29,75 ± 2,86	b	53,70 ± 7,34
	1	100 ± 0	4,25 ± 0,87	16,00 ± 6,21	a	39,05 ± 15,55

FONTE: O autor (2018).

NOTA: (1) grupos iguais, na mesma coluna, representam resultados sem diferença significativa; grupos diferentes, na mesma coluna, representam resultados com diferença significativa; (2) os grupamentos estatísticos foram colocados apenas para os testes com diferença entre as médias.

O aumento na busca por herbicidas alternativos, aliado às evidências de que alguns metabólitos secundários agem como herbicidas naturais (REGIOSA et al., 2013), apontam para o aprofundamento no estudo das amostras que se mostraram ativas no ensaio fitotóxico.

Assim, pode-se dizer que as frações acetato de etila e clorofórmio das folhas e galhos, e a fração hexano dos galhos constituem amostras com potencial de atividade herbicida, visto que se destacaram na inibição do crescimento de sementes de alface. Ainda, seria interessante aprofundar os estudos fitotóxicos com a fração remanescente das folhas, tendo em vista o efeito hormético apresentado por ela.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nas análises morfoanatômicas evidenciaram estruturas condizentes com o previsto para a família e gênero. Porém, algumas características se destacaram, no sentido de auxiliar na diferenciação da espécie. Nesse sentido pode-se citar a presença de raros estômatos actinocíticos, células oleíferas, e ausência de células secretoras de mucilagem nas folhas. Ainda, destacou-se o formato formato côncavo-convexo do pecíolo, e a presença de escassos tricomas tectores e de células de óleo essencial; e ausência de compostos fenólicos nos galhos em ensaios histoquímicos.

O estudo da composição fitoquímica preliminar e o análise por CCD sugerem a presença de esteroides e triterpenos, flavonoides, cumarinas, alcaloides e saponinas. Ainda, foi possível isolar e identificar por cristalografia o aminoácido 4-hidróxi-N-metilprolina, da fração remanescente dos galhos.

A quantificação de clorofilas e carotenoides revelou uma maior concentração dessas substâncias nas folhas.

A extração do óleo essencial a partir de duas coletas em períodos distintos evidenciou a diferença no rendimento e na complexidade de composição. Por outro lado, a julgar pelos compostos majoritários, as duas amostras constituem interessantes alvos para estudos de citotoxicidade *in vivo*.

Em relação às atividades antioxidantes, avaliada por 3 metodologias distintas (formação do complexo fosfomolibdênio, redução do DPPH• e co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico), os melhores resultados foram obtidos para a fração acetato de etila e etanólica dos galhos.

A toxicidade preliminar frente a *Artemia salina* e o ensaio de hemólise apontam para um potencial citotóxico da fração hexano do galho e do óleo essencial.

O resultado de atividade fitotóxica corrobora com o descrito para a toxicidade em *Artemia salina* e hemólise, onde evidencia o potencial tóxico da fração hexano do galho. Além disso, o ensaio sugere a presença de compostos bioativos nas frações clorofórmio e acetato de etila das folhas e galho.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por tratar-se de um trabalho realizado com uma espécie pouco estudada, os resultados obtidos contribuem com a caracterização da *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. e auxiliam no direcionamento de estudos futuros.

Tendo em vista os resultados obtidos, sugere-se a continuação dos estudos com a espécie, a fim de avaliar seu real potencial de aplicabilidade. Nesse sentido, seria interessante avaliar as amostras, especialmente as que se destacaram neste trabalho, em relação a toxicidade em células tumorais, aplicabilidade como herbicida natural e atividade antimicrobiana e antiprotzoária.

Vale ressaltar que o uso das folhas e galhos de *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. caracterizam um reaproveitamento de tais partes aéreas, que geralmente são descartadas pelas indústrias madeireiras.

REFERÊNCIAS

- ABUH-IRMAILEH, B. E.; AFIFI, F. U. Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 193-197, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14611882>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.
- ADAMS, R. P. **Identification of the essential oil componentes by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AMARANTE, C. B. et al. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672011000300015&script=sci_abstract>. Acesso em: 7 de novembro de 2017.
- ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- ARCHILA, E. G.; SUARÉZ, L. E. C. Phytochemical study of leaves of *Ocotea caudata* (Nees) Mez. **Natural Product Research**, Colombia, v. 32, n. 2, p. 195-201, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28669232>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.
- ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA (ACP). Ailton Rodrigues Pinto Junior; Sylvio Péllico Netto. **Óleos essenciais para controle de pragas**. PI 0805965-9 A2, 29 Set. 2008, 24 Ago. 2010.
- BAKER, D. D.; et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Products Report**, United Kingdom, v. 24, p. 1225-1244, 2007. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2007/np/b602241n>>. Acesso em: 19 de abril de 2016.
- BALLABENI, V. et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, Londres, v. 55, p. 23-30, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079160>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.
- BALTINA, L. A. et al. Lupane triterpenes and derivatives with antiviral activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Estados Unidos, v. 13, n. 20, p. 3549-3552, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X03007145>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

BANERJEE, A. et al. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from APPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, India, v. 174, n. 2, p. 134-139, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279708002731?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 de março de 2017.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. GC-MS analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n1/a09v18n1.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos, **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300012>. Acesso em: 19 de abril de 2016.

BARRERA, G. et al. Mitochondrial dysfunction in cancer and neurodegenerative diseases: spotlight on fatty acid oxidation and lipoperoxidation products. **Antioxidants**, Itália, v. 5, n. 1, p. 1-25, 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-3921/5/1/7/html>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

BEIRITH, A. et al. Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentic acid isolated from the stem bark of *Ocotea suaveolens*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 65, n. 1, p. 50-55, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10083846>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, Hong Kong, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796902924>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa: Ames, 1976. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

BETIM, F. C. M. **Estudo fitoquímico e biológico da espécie *Ocotea nutans* (Nees) Mez, LAURACEAE**. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

BOJOVIĆ, B.; STOJANOVIĆ, J. Chlorophyll and carotenoid content in wheat cultivars as a function of mineral nutrition. **Archives of Biological Sciences**, Sérvia e Montenegro, v. 57, n. 4, p. 283-290, 2005. Disponível em: <<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0354-4664/2005/0354-46640504283B.pdf>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2018.

BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/saude/uma%20abordagem.pdf>>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

BORS, W.; BUETTNER, G. R. **Vitamin C in health and disease**. Nova York: Marcel Dekker Inc., 1997.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, United Kingdom, v. 3, n. 18, p. 1-8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1891273/pdf/1746-4269-3-18.pdf>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food and Science Technology**, França, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>>. Acesso em: 04 de novembro de 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº. 06, de 23 de setembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 185, 24 set. 2008. Seção 1, p. 75. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em: 11 de julho de 2016.

BROOKS, C. J. W.; CAMPBELL, M. M. Caparrapi oxide, a sesquiterpenoid from caparrapi oil. **Phytochemistry**, Nova York, v. 8, p. 215-218, 1969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003194220085815X>>. Acesso em: 05 de setembro de 2016.

BROTTO, M. L.; CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. dos. O gênero *Ocotea* (Lauraceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 495-525, 2013. Disponível em: <<http://rodriguesia-seer.jbrj.gov.br/index.php/rodriguesia/article/view/ID%20694>>. Acesso em: 05 de julho de 2016.

CANDIDO, L. P. et al. Evaluation of the allelopathic potential of leaf, stem and root extracts of *Ocotea pulchella* Nees et Mart. **Chemistry and Biodiversity**, São Paulo, v. 13, n. 8, p. 1058-1067, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27482860>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2018.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher). **Perspectiva**, Erechim, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010. Disponível em: <http://www.uricer.edu.br/site/pdfs/perspectiva/127_129.pdf>. Acesso em: 15 de março de 2018.

CAPUTO, L. F. F.; GINTINARA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2011. v. 2.

CARVALHO, J. L. C. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

CASTELLANI, D. C. Produção de óleo essencial em canela (*Ocotea odorífera* Vell.) e guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) em função da época da colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 104-107, 2006. Disponível em: <http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06_3/artigo20_v8_n4.pdf>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

CASTRO, M. D. L. de.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 1-10, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267098002335>>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

CASTRO, M. D. L. de.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, Córdoba, v. 1217, n. 16, p. 2383-2389, 2010. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0021967309016884/1-s2.0-S0021967309016884-main.pdf?_tid=0b8c45bc-f4ce-11e7-80c3-00000aab0f01&acdnat=1515455325_ae26d491466711dcacc2719d8d753e7c>. Acesso em: 13 de outubro de 2017.

CAVA, M. et al. *Ocotea* alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 20, n. 20, p. 2437-2442, 1968. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403900761508>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, Índia, v. 17, n. 2, p. 149-151, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19576741>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

CHAVERRI, C.; CICCIO, J. F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. **Revista de Biología Tropical**, Costa Rica, v. 53, n. 3-4, p. 431-436, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442005000200011&script=sci_arttext>. Acesso em: 7 de janeiro de 2018.

CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KRÓL, W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. **Molecules**, Polônia, v. 20, n. 1, p. 1610-1625, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/20/1/1610/htm>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

COUTINHO, D. F. et al. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 2, 2006a. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n2/v16n2a08.pdf>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2017.

CORDEL, G. A.; QUIRN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, Estados Unidos, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351353>>. Acesso em: 16 de junho de 2016.

COUTINHO, D. F. et al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroidae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 537-544, 2006b. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n4/a17v16n4.pdf>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

CUTTER, E. **Anatomia vegetal**: Células e tecidos. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986.

DALL'STELLA, D. S. G. **Estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) e de suas ações antibacteriana, antifúngica, alelopática, antioxidante e toxicológica**. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DAMASCENO, C. S. B. **Estudo fitoquímico, antioxidante, antibacteriano, toxicidade e identificação botânica de *Ocotea bicolor* Vattimo-Gil (Lauraceae)**. 2017. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

DAMASCENO-JUNIOR, G. A. et al. Structure, distribution of species and inundation in a riparian forest of Rio Paraguai, Pantanal, Brazil. **Flora**, Freiberg, v. 200, p. 119-135, 2005. Disponível em: <<http://www2.ib.unicamp.br/profs/fsantos/refer/Flora-2005-200-119.pdf>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

DARLINGTON, A.; HIRONS, M. J. D. **The pocket encyclopaedia of plant gall colour**. London: Blandford, 1975.

DEMMIG-ADAMS, B.; GILMORE, A. M.; ADAMS III, W. W. Carotenoids 3: in vivo functions of carotenoids in higher plants. **The FASEB Journal**, Estados Unidos, v. 10, n. 4, p. 403-412, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647339>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

DIAS, C. S. et al. Isolamento e identificação de novos alcalóides de *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, supl., p. 62-62, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v13s1/a23v13s1.pdf>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

DIAS, D. A.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Further neolignans from *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, Nova York, v. 25, n. 11, p. 2613-2616, 1986. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200845203>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

DOGIMONT, C. et al. One dominant gene conferring the resistance to the leafminer, *Lirizyoma trifolii* (Burgess) Diptera: Agromyzidae in melon (*Cucumis melo* L.). **Euphytica**, Holanda, v. 105, n. 1, p. 63-67, 1999. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1003436428847>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2018.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000200031&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. Oxford: Pergamon Press, 1990.

FANINI, F.; LABBÉ, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Santiago, v. 27, n. 7, p. 673-679, 1999. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0305197898001318/1-s2.0-S0305197898001318-main.pdf?_tid=c2136aa2-f3ef-11e7-a2e0-00000aab0f6b&acdnat=1515359863_835de9c0f706dbaadf30526bf7f93c58>. Acesso em: 18 de dezembro de 2017.

FARAGO, P. V. et al. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Ponta Grossa, v. 15, n. 3, p. 250-255, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v15n3/a16v15n3.pdf>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2017.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia brasileira: história, índices e consequências. **Megadiversidade**, Manaus, v. 1, n. 1, p. 113-123. Disponível em: < <http://www.mstemdados.org/sites/default/files/Desmatamento%20na%20Amazonia%20brasileira,%20historia,%20indices%20e%20consequencias%20-%20Philip%20Fearnside%20-%202005.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

FERREIRA, D. F. Sistema de análises de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 2014. 1 CD-ROOM. SISVAR 4.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. 2 ed. Nova York: D. Van Nostrand Company Inc., 1949.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH• radical in alcoholic solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, Itália, v. 69, n. 7, p. 2309-2314, 2014. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo035758q>>. Acesso em: 11 de setembro de 2017.

FUCHS, C. H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of the whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, n. 3, p. 141-144, 1963. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10520296309067156>>. Acesso em: 19 de maio de 2016.

GARCEZ, F. et al. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 77, n. 4, p. 383-387, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922653> >. Acesso em: 14 de julho de 2016.

GARCEZ, W. S. et al. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, Campo Grande, v. 16, n. 6B, p. 1382-1386, 2005. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v16n6b/27336.pdf>>. Acesso em: 08 de janeiro de 2018.

GARCEZ, W. S. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil. **Bioresource Technology**, Nova York, v. 100, p. 6647-6650, 2009. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409007780>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. **Phytochemistry**, Nova York, v. 39, n. 4, p. 815-816, 1995. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229400961R>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

GARRET, R. et al. Chemical composition and toxicity of *Ocotea nonata* (Nees) Mez essential oil. **Journal of essential oil bearing plants**, Londres, v. 13, n. 4, p. 455-459, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643849>>. Disponível em: 15 de março de 2018.

GILBERT, B. et al. The aporphine and isoquinolinedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 86, n. 4, p. 694-696, 1964. Disponível em: < <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01058a031>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

GIORDANI, R. B. et al. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico do *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2042-2046, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800024>. Acesso em: 12 de maio de 2016.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol30No2_374_25-RV05289.pdf>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

HARTLEY, S. E. The chemical composition of plant galls: are levels of nutrients and secondary compounds controlled by the gall-former? **Oecologia**, Reino Unido, v. 113, n. 4, p. 492-501, 1998. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s004420050401#citeas>>. Acesso em: 15 de março de 2018.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, United Kingdom, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10856912>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, United Kingdom, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1359644608002651/1-s2.0-S1359644608002651-main.pdf?_tid=bfb29f02-0694-11e6-aa1d-00000aab0f01&acdnat=1461114842_2266f131ce925220191565183c27a77d>. Acesso em: 18 de abril de 2016.

HEISS, S. C. M. **Estudos químicos, biológicos e farmacológicos com *Vochysia divergens* Pohl (VOSCHYSIACEAE) E COM *Ocotea suaveolens* (Meissn.) Hassler (LAURACEAE)**. 1995. 186 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1995.

HOWE, H. F.; WESTLEY, L. C. **Ecological relationships of plants and animals**. Oxford: Oxford University Press, 1988.

IBM Corporation. IBM SPSS Statistics para Windows. Versão 22.0. Armonk, NY: IBM Corp, 2013.

INOUE, M. T. Teor de clorofila de seis espécies arbóreas sob influência da poeira de cimento. **Revista Floresta**, Brasil, v. 40, n. 2, p. 457-464, 2010. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/17841/11642>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2018.

ISHIGE, M. et al. Neolignans from *Ocotea chatarinensis*. **Phytochemistry**, Nova York, v. 30, n. 12, p. 4121-4128, 1991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942291834795>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

JAIN, S. C. et al. Alkaloids from *Toddalia aculeata*. **Phytochemistry**, India, v. 67, n. 10, p. 1005-1010, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647728>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2018.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. Nova York: McGraw Hill Book, 1940.

KOHN, L. K. et al. In vitro activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba roseodora*) against bovine herpesvirus type 5 and avian metapneumovirus.

Pharmaceutical biology, Lisse, v. 50, n. 10, 2012. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22873798>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

KONG, D. G. et al. The genus *Litsea* in tradicional chinese medicine: an ethnomedical, phytochemical and pharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 164, p. 256-264, 2015. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25698244>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I **Biodiversidade brasileira**: síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Unicamp, 2000.

LI, Z. H. et al. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, China, v. 15, n. 12, p. 8933-8952, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139532>>. Acesso em: 21 de janeiro de 2018.

LIAW, C. C. et al. Anti-inflammatory lanostanoids and lactone derivatives from *Antrodia camphorata*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 76, n. 4, p. 489-494, 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np300443p>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

LOREGIAN, A. C. et al. Padrões espaciais e ecológicos de espécies arbóreas refletem a estrutura em mosaicos de uma floresta subtropical. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 593-606, 2012. Disponível em: <
<http://www.scielo.br/pdf/abb/v26n3/v26n3a09.pdf>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

LORENZO, D. et al. Asaricin, the main componente of *Ocotea opifera* Mart. essential oil. **Natural Product Letters**, Chur, v. 15, n. 3, p. 163-170. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11858548>>. Acesso em: 05 de setembro de 2016.

LU, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Houston, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754673>>. Acesso em: 04 de novembro de 2017.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Portugal, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18374697>>. Acesso em: 03 de novembro de 2017.

MANI, M. S. **Ecology of plant galls**. Califórnia: W. Junk, 1964.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001. Disponível em: <
<http://www.floram.org/files/v8n%C3%BAnico/v8nunicoa25.pdf>>. Acesso em: 12 de julho de 2016.

MARTINI, L. H. et al. Naturally occurring compounds affect glutamatergic neurotransmission in rat brain. **Neurochemical Research**, Nova York, v. 32, p. 1950-1956, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17577666>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

MARTINS, A. et al. Spathulenol inhibit the human ABCB1 efflux pump. **Planta Médica**, Hungria, v. 76, n. 12, p. 608, 2010. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0030-1264906>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, Editora Universitária, 1994.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, Estados Unidos, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568163707000712>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

MELO, J. O. de. et al. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2241-2245, 2006. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-17077521>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: systematic anatomy of the leaf and stem**. Oxford: Clarendon, 1987.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 15, n. 2, p. 127-130. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11268111>>. Acesso em: 15 de julho de 2016.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396775>>. Acesso em: 12 de julho de 2016.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**. Curitiba, 2003.

MIGUEL, O. G. "Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (*Nasturtium officinale*) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícias e afins". PI 06017063-7 A2, 05 Apr. 2006, 11 Dec. 2007

MIKAILI, P.; SHAYEGH, J.; ASGHARI, M. H. Review on the indigenous use and ethnopharmacology of hot and cold natures of phytomedicines in the Iranian traditional medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Hainan, v. 2, n. 2, p. 1189-1193, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169112603827>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica**: patrimônio nacional dos brasileiros. MMA: Brasília, 2010.

MOLISCH, H. **Der einfluss einer pflanze auf die andere-allelopathie**. Jena: Fischer, 1937.

MONTRUCCHIO, D. P. et al. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, n. 14, p. 1543-1548, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22815198>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

MOREIRA, D. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NABAVI, S. F. et al. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries. **Nutrients**, Basileia, v. 7, n. 9, p. 7729-7748, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4586554/>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. A simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tóquio, v. 39, n. 10, p. 925-928, 1992. Disponível em: < https://www.jstage.jst.go.jp/article/nskkk1962/39/10/39_10_925/_pdf/-char/en>. Acesso em: 10 de dezembro de 2017.

NAIDU, B. P. et al. Proline analogues in *Melaleuca* species: response of *Melaleuca lanceolata* and *M. Uncinata* to water stress and salinity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Australia, v. 14, n. 6, p. 669-677, 1987. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/fp/PP9870669>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, Houston, v. 164, n. 6, p. 901-909, 2003. Disponível em: < https://ac.els-cdn.com/S0168945203001201/1-s2.0-S0168945203001201-main.pdf?_tid=94ebeca2-f499-11e7-9021-00000aab0f02&acdnat=1515432793_4a77d241ef4221eab9dc3d8cc3b297f9>. Acesso em: 17 de dezembro de 2017.

NIKI, E. Do antioxidants impair signalling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS Letters**, Japão, v. 586, p. 3767-3770, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.febslet.2012.09.025/full>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

OLIVEIRA, D. C. de. et al. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 657-667, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-84042006000400015&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 15 de março de 2018.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

PABON, L.; CUCA, L. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 875-879, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000400021&lang=pt>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

PARK, K. R. et al. β -caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Letters**, Singapura, v. 312, n. 2, p. 178-188, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924548>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2018.

PINTO, A. C.; et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 45-61, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000800009&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 18 de abril de 2016.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v. 269, p. 337-341, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269799940198>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

QUINET, A. et al. Lauraceae. In: FORZZA, R. C. et al (Ed.). **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8440>>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

RAKOTONDRAIBE, L. H. et al. Neolignans and other metabolites from *Ocotea cymosa* from the Madagascar rain forest and their biological activities. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 78, p. 431-440, 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np5008153>>. Acesso em: 15 de setembro de 2016.

RAVINDRAN, P. N.; NIRMAL-BABU, K.; SHYLAJA, M. Cinnamon and cassia: the genus *Cinnamomum*. Boca Raton: CRC Press, 2004.

REGIOSA, M. et al. Allelopathic research in Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 27, n. 4, p. 629-646, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062013000400001>. Acesso em: 13 de janeiro de 2018.

RIEDERER, M.; SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 363, p. 2023-2032, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/52/363/2023/488459>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

RIVERA, D.; OBÓN, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 46, p. 73-93, 1995.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887419501239A>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. Botânica econômica brasileira. 2 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. **HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis**. Washington: IFPRI/CIAT, 2004.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

ROGINSKI, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604005904>>. Acesso em: 15 de março de 2018.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. (Ed.). **The families and genera of vascular plants**. Berlim: Springer-Verlag, p.366-391.

ROUSSEL-UCLAF. Julien Warnant *et al.* **Process of the preparation of glaziovine**. 05/444.554, 21 Fev. 1974, 13 Jan. 1976.

RUFINO, M. do S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema β -caroteno/ácido linoléico. **Comunicado Técnico**, Fortaleza, n. 126, 2006. Disponível em: <

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/664093/1/cot126.pdf>>. Acesso em: 22 de outubro de 2017.

SAAB, A. M. et al. Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. **Natural Product Research**, v. 26, n. 18, p. 1741-1745, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22017546> >. Acesso em: 12 de fevereiro de 2017.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F.; YEN, K. H. Chemical compositions and biological activities of the essential oils of *Beilschmiedia madang* Blume (Lauraceae). **Archives of Pharmacal Research**, Malásia, v. 38, n. 4, p. 485-493, 2015.

Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12272-014-0460-z> >. Acesso em: 17 de fevereiro de 2017.

SALLEH, W. M. N. H. W. et al. Comparative study of the essential oils of three *Beilschmiedia* species and their biological activities. **Food and Science Technology**, Malásia, v. 51, p. 240-249, 2016. Disponível em: <

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijfs.12962/abstract>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2017.

SALLEH, W. M. N. H. W.; AHMAD, F. Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): a review on recent research results (2000-2016).

Journal of Applied Pharmaceutical Science, Malásia, v. 7, n. 5, p. 204-218, 2017.

Disponível em: < http://japsonline.com/admin/php/uploads/2284_pdf.pdf>. Acesso em: 08 de janeiro de 2018.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1013386921596>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

SANTOS, L. B. et al. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 4, p. 532-538, 2013. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612013000400532&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 12 de julho de 2016.

SANTOS, M.; OLIVEIRA, P. L. de. Aspectos anatômicos do pecíolo de quatro espécies do gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul.

Insula, Florianópolis, v. 24, p. 3-14, 1995. Disponível em: <

<https://periodicos.ufsc.br/index.php/insula/article/view/21966>>. Acesso em: 19 de dezembro de 2017.

SANTOS, M. H. dos. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300020>. Acesso em: 04 de novembro de 2017.

SARHAN, S.; SEILER, N. Proline and proline derivatives as anticonvulsivants.

General Pharmacology: The Vascular System, Reino Unido, v. 20, n. 1, p. 53-60, 1989. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0306362389900608>>. Acesso em: 26 de janeiro de 2018.

SASS, J. **Botanical Microtechnique**. 2. ed. Iowa: Ames, 1951.

SCHWARZ, K. et al. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds.

European Food and Research Technology, Alemanha, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001. Disponível em: <

<https://link.springer.com/article/10.1007/s002170000256#citeas>>. Acesso em: 04 de novembro de 2017.

SENSCH, O. et al. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and

nifedipine. **British Journal of Pharmacology**, Alemanha, v. 131, n. 6, p. 1089-1096, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082115>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Nova Deli, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274824>>. Acesso em: 17 de julho de 2017.

SHEPHERD, G. J. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil**: Plantas terrestres. São Paulo: Unicamp, 2003.

SILVA, L. de L. et al. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ni/v11n2/1679-6225-ni-11-02-0443.pdf>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, Rio Grande do Sul, v. 93, p. 14-18, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629914000489>>. Acesso em: 17 de abril de 2016.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v22n1/1143>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

SILVA, J. R. de A. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. **Amazonia**, Brasil, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532009000600011>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010. Disponível em: <<file:///Users/natashafabri/Downloads/6510-23892-1-PB.pdf>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

SILVA, W. da.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. **Phytochemistry**, Nova York, v. 28, n. 2, p. 661-661, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942289800822>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

SIMIC, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, Montenegro, v. 18, n. 9, p. 713-717, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15478207>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine-specific production in *Listeria monocytogens* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. **Antimicrobial Agents and Resistance**, Edinburgo, v. 51, n. 7, p. 567-574, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12132773>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2017.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, Santa maria, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000300043>. Acesso em: 15 de março de 2018.

TABANCA, N. et al. Comparative investigation of *Umbellularia californica* and *Laurus nobilis* leaf essential oils and identification of constituents active against *Aedes aegypti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 61, n. 50, p. 12283-12291, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24266426>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

TAKAKU, S.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 35, p. 525-532, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305197807000312>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

TANVEER, A. et al. Allelopathic effects of aqueous and organic fractions of *Euphorbia dracunculoides* Lam. On germination and seedling growth of chickpea and wheat. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Paquistão, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-58392012000400006&script=sci_abstract&lng=en>. Acesso em: 21 de janeiro de 2018.

THANAN, R. et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and câncer. **International Journal of Molecular Science**, Tailândia, v. 16, n. 1, p. 193-217, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/16/1/193/htm>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

THE PLANT LIST. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 02 de julho de 2016.

TOGNOLINI, M. et al. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences**, Oxford, v. 78, n. 13, p. 1419-1432, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320505009392>>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

TRAJANO, V. N. et al. Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 771-775, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000300032>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2017.

UENOJO, M.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n3/21.pdf>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

ULUBELEN, A. et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. **Phytochemistry**, Reino Unido, v. 36, n. 4, p. 971-974, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765213>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC); UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR); UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (UFSM). Obdúlio Gomes Miguel *et al.* **Identificação da propriedade antinociceptiva (analgésica) do alcalóide aporfirínico S-(+)-dicentrina e usos do mesmo**. BR102014016339-5A2. 01 Set. 2014, 10 Fev. 2016.

VALENTE, L. M. M. et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 216-223, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n2/v16n2a15>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2017.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Missouri, v. 83, n. 3, p. 409-418, 1996. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/2399870?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 05 de julho de 2016.

VATTIMO-GIL, I. Flora da cidade do Rio de Janeiro (Lauraceae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 33, p. 157-176, 1957. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/23491992?seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em: 23 de abril de 2016.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Alkaloids of *Ocotea brachyobotra*. **Farmaco Edizione Scientifica**, Pávia, v. 32, n. 11, p. 767-769, 1977. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-923790>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

VIATOR, R. P. et al. Allelopathic, autotoxic, and hormetic effects of postharvest sugarcane residue. **Agronomy Journal**, Estados Unidos, v. 98, n. 6, p. 1526-1531, 2006. Disponível em: <<https://dl.sciencesocieties.org/publications/aj/abstracts/98/6/1526>>. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.

VONGSOMBATH, C. et al. Mosquito (Diptera: Culicidae) repellency field tests of essential oils from plants traditionally used in Laos. **Journal of Medical Entomology**, Suíça, v. 49, n. 6, p. 1398-1404, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270168>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2017.

VON HERTWIG, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem e comercialização**. São Paulo: Ícone, 1991.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlim: Springer, 1996.

WANG, X. S. et al. The effect of δ -elemene on hela cell lines by apoptosis induction. **Yakugaku Zasshi**, Japão, v. 126, n. 10, p. 979-990, 2006. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/126/10/126_10_979/_pdf/-char/en>. Acesso em: 07 de janeiro de 2018.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 1, n. 1, p. 1-112, 1963.

WERKA, J. S.; BOEHME, A. K.; SETZER, W. N. Biological activities of essential oils from Monteverde, Costa Rica. **Natural Products Communication**, Estados Unidos, v. 2, n. 12, p. 1215-1219, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282395329_Biological_activities_of_essential_oils_from_Monteverde_Costa_Rica>. Acesso em: 15 de março de 2017.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Damage to dna by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to câncer. **Biochemical Journal**, Londres, v. 313, p. 17-29, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1216878/pdf/8546679.pdf>>. Acesso em: 04 de novembro de 2017.

XIE; C. Y. et al. Cell apoptosis induced by δ -elemene in colorectal adenocarcinoma cells via a mitochondrial-mediated pathway. **Yakugaku Zasshi**, Japão, v. 129, n. 11, p. 1403-1413, 2009. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/129/11/129_11_1403/_pdf/-char/en>. Acesso em: 07 de janeiro de 2018.

YAMAGUCHI, K. K. de L.; ALCÂNTARA, J. M.; JUNIOR, V. F. da V. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 42, n. 4, p. 541-546, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v42n4/a12v42n4.pdf>>. Acesso em: 03 de novembro de 2017.

YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geraniato de metila. **Química Nova**, Campinas, v. 36, n. 8, p. 826-830, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013000600015&script=sci_abstract>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2017.

YANG, Y. et al. The fungicidal terpenoids and essential oil from *Litsea cubeba* in Tibet. **Molecules**, China, v. 15, n. 10, p. 7075-7082, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20944522>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2017.

YAPP, D. T. T.; STEED, J. W.; HOUGHTON, P. J. 4-hydroxy-N-methylproline. **Acta Crystallographica Section E**, Malásia, v. E58, p. 988-989, 2002. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?ob6161>>. Acesso em: 25 de janeiro de 2018.

ZHANG, F. et al. Synergistic antitumor effect of β -elemene and etoposide is mediated via induction of cell apoptosis and cell cycle arrest in non-small cell lung carcinoma cells. **Molecular Medicine Reports**, China, v. 4, n. 6, p. 1189-1193, 2011. Disponível em: <file:///Users/natashafabri/Downloads/mmr_4_6_1189_PDF.pdf>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

ZHANG, X. et al. Beta-elemene blocks epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cell line MCF-7 through Smad3-mediated down-regulation of nuclear transcription factors. **PLOS ONE**, China, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058719>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2018.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100020>. Acesso em: 13 de julho de 2016.

ZEINO, M. et al. Cytotoxicity of cardiotonic steroids in sensitive and multidrug-resistant leukemia cells and the link with Na^+/K^+ ATPase. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Alemanha, v. 150, p. 97-111, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096007601500093X>>. Acesso em: 09 de janeiro de 2018.

ZSCHOCKE, S. et al. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. **Phytochemistry**, Nova York, v. 54, p. 591-595, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942200001631>>. Acesso em: 14 de julho de 2016.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO
GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,
DE 27 DE ABRIL DE 2011
Nº 03/2014**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, as **atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.


Volney Zanardi Junior
Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.